

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



PAPEL DOS MECANISMOS ENVOLVENDO ESTERÓIDES
SEXUAIS (E1 E E2), SUA VARIAÇÃO GENÉTICA E
BIOMARCADORES CIRCULANTES NA ETIOPATOGENIA DE
TUMORES GINECOLÓGICOS (LEIOMIOMAS E CANCRO DO
COLO DO ÚTERO)

Cindy Duarte Castelão

Dissertação

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2013

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



PAPEL DOS MECANISMOS ENVOLVENDO ESTERÓIDES
SEXUAIS (E1 E E2), SUA VARIAÇÃO GENÉTICA E
BIOMARCADORES CIRCULANTES NA ETIOPATOGENIA DE
TUMORES GINECOLÓGICOS (LEIOMIOMAS E CANCRO DO
COLO DO ÚTERO)

Dissertação para obtenção do grau de mestre orientada por:

Professora Doutora Maria Clara Bicho, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e
Instituto de Medicina Molecular

Professor Doutor Pedro Silva, Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências
da Universidade de Lisboa

Cindy Duarte Castelão

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2013

Dedicado à minha mãe, pai e irmão.
Sem vocês não seria possível.

AGRADECIMENTOS

É com muito orgulho que finalizo esta etapa da minha carreira académica, mas sei que não o conseguiria ter realizado sem a ajuda de várias pessoas, às quais agradeço profundamente.

Começo, assim, por agradecer ao Professor Doutor Manuel Bicho, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Lisboa e Director do Laboratório de Genética, pela oportunidade para realizar este trabalho.

Queria, igualmente, agradecer à Professora Doutora Maria Clara Bicho, à Dra. Irina Alho e ao Professor Doutor Pedro Silva por toda a ajuda, direcção e conselhos que me ajudaram durante este último ano. Ao Instituto Rocha Cabral pelo financiamento parcial deste trabalho. Ao Professor Doutor João Pisco do Hospital St. Louis, e ao Professor Doutor Rui Medeiros do Instituto de Oncologia do Porto por terem fornecido as amostras patológicas para este estudo e por toda a disponibilidade prestada. À Dra. Alda Pereira da Silva pelo apoio na organização das bases de dados. A todas as colaboradoras do laboratório: Dras. Joana Ferreira, Andreia Matos, Técnica Conceição Afonso e Ângela Gil, por toda a ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer aos meus companheiros de guerra do laboratório, com os quais trabalhei, e que proporcionaram sempre um ambiente de camaradagem: obrigada Rui Reis e Ridhi Prabhudas.

À minha malta de conversas do café e desabafos: Nany, Maggie e Fi. Não o teria conseguido fazer sem vocês; obrigada por toda a ajuda e por estarem sempre disponíveis. Vamos ter sempre 22 anos – ou pelo menos dançar como se os tivéssemos.

Aos meus amigos, que já são família, e que me apoiaram/acompanharam sempre neste percurso académico, independentemente da distância, ou do facto de não me quererem deixar vir para Lisboa (Rita Ribeiro!): Rita Ribeiro, Sónia Sacramento, Rita Colaço, Inês Castro e Pedro Batista .

A todos os meus outros amigos que me ouviram, apoiaram e, me fizeram sentir acompanhada neste percurso – obrigada.

Por fim, à minha família. O que seria de mim sem o vosso apoio incondicional? Mãe, pai e Dário, adoro-vos imenso, mesmo quando estou mal-disposta. Tios, primos e avô: obrigada pela força e apoio.

As coisas boas da vida só fazem sentido quando são partilhadas: obrigada por me deixarem partilhar este pedaço da minha vida com vocês.

ÍNDICE GERAL

Índice de Abreviaturas	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
I – Introdução Teórica.....	1
1- Estrogénios	1
1.1 – Acções gerais dos estrogénios.....	1
1.2 – Biossíntese e metabolismo dos estrogénios	2
1.3 – Relação entre tumorigénese e estrogénios	3
2 – Tumores Ginecológicos.....	5
2.1 – Leiomiomas	5
2.1.1 – Etiopatogenia e epidemiologia	5
2.1.2 – Relação entre leiomiomas e estrogénio	6
2.2 – Cancro do colo do útero.....	6
2.2.1 – Etiopatogenia e epidemiologia	6
2.2.2 – HPV	7
2.2.2.1 – Ciclo Viral	7
2.2.2.2 – Progressão da doença	8
2.2.3 – Interação entre HPV e estrogénio	8
3 – Polimorfismos em estudo	9
3.1 – Citocromo P450.....	9
3.1.1 – Citocromo P450 1A1 (CYP1A1)	10
3.2 – Catecol-O-metil-trasferase (COMT)	10
3.3 – Mieloperoxidase (MPO)	11
4- Redutase Transmembranar dos eritrócitos	11

II – Objectivos	12
III – Materiais e Métodos	13
1- Descrição da população	13
2- Extracção de DNA	13
3- Quantificação de DNA	13
4- Amplificação de DNA	13
5- Genotipagem	14
6- Determinação da actividade da Redutase Transmembranar Eritrocitária	15
7- Determinação de 17 β -estradiol (E2)	15
8- Análise estatística	15
IV – Resultados	16
1 – Análise do polimorfismo do CYP1A1	16
2 – Análise do polimorfismo da COMT	18
3 – Relações epistáticas entre os polimorfismos de CYP1A1 e COMT	20
4 – Análise do polimorfismo da MPO	21
5 – Análise da actividade da redutase transmembranar de ferricianeto dependente de NADH	23
6 – Análise de 17 β - estradiol (E2) circulante	23
V – Discussão	24
VI – Conclusão e considerações finais	29
VII – Bibliografia	30
VIII – Anexos	35
Anexo A – Complementos para a Introdução Teórica.....	35
Anexo A.1 – Ciclo menstrual das mulheres	35
Anexo A.2 – Ciclo viral do HPV	36
Anexo A.3 – Processos oncogénicos do HPV	36
Anexo B – Protocolos	37

Anexo B.1 – Protocolo de extracção de DNA por método de <i>salting-out</i>	37
Anexo B.2 – Protocolo “Actividade da Redutase Transmembranar”	38
Anexo B.2.1 – Leitura de absorvência (535 nm)	38
Anexo B.2.2 – Determinação do hematócrito	38
Anexo B.2.3 – Curva de calibração	39
Anexo B.2.4 – Cálculo da Actividade da Redutase Transmembranar	39
Anexo B.3 – Kit ELISA “Estradiol Assay” de R&D Systems (Número de catálogo KGE014)	39
Anexo B.2.1 – Curva de Calibração	40
Anexo C – Complementos para Resultados	40
Anexo C.1 – Sequências de corte das enzimas utilizadas para a genotipagem	40
Anexo C.2 – Marcadores de peso molecular de DNA	40

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2-Me-O-E2	2-metoxi-estradiol
4-Me-O-E2	4-metoxi-estradiol
2-OH-CE	2-hidroxi-estrogénio
4-OH-CE	4-hidroxi-estrogénio
A	Adenina
C	Citosina
CC	Cancro do colo do útero
CE	Catecol-estrogénios
CE-Q	Quinonas de catecol-estrogénios
CIN	<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>
Cl ⁻	Anião de cloreto
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CYP	Citocromo P450
CYP1A1	Citocromo P450 da família 1 sub-família A e subclasse 1
CYP1A2	Citocromo P450 da família 1 sub-família A e subclasse 2
CYP1B1	Citocromo P450 da família 1 sub-família B e subclasse 1
CYP3A4	Citocromo P450 da família 3 sub-família A e subclasse 4
CYP17	Citocromo P450 da família 17
CYP19	Citocromo P450 da família 19 (aromatase)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	17- β -estradiol
E2F	Factor de transcrição
E3	Estriol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Er	<i>Estrogen Receptor</i>
Er α	<i>Estrogen Receptor α</i>
Er β	<i>Estrogen Receptor β</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
G	Guanina
GnRH	Hormona libertadora de gonadotropina
GPR30	<i>G protein-coupled receptor 30</i>
GSH	Glutationo

H ₂ O ₂	Hidrogénio de peróxido
HOCL/OCL ⁻	Ácido hipocloroso
HPV	Papiloma vírus humano
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HWE	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
Il	Interleucina
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mmol	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensafgeiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADH/NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
Ng	Nanograma
OR	<i>Odds ratio</i>
PAH	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pg	Picograma
PMN	Neutrófilos polimorfo-nucleares
pRB	Proteína retinoblastoma
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RTM	Redutase transmembranar
SAM	S-adenosil-metionina
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
T	Timina
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
μL	Microlitro
χ ²	Qui-quadrado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Paradigma clássico e moderno dos efeitos tumorigénicos dos estrogénios	4
Figura 2 – Relação entre o metabolismo dos estrogénios e tumorigénese	5
Figura 3 – Interação proposta para a relação entre estrogénio e HPV E6/ E7 , que resulta em cancro do colo do útero	9
Figura 4 – Respresentação do gene de CYP1A1	10
Figura 5 – Respresentação do gene da COMT	10
Figura 6 – Respresentação do gene da MPO	11
Figura 7 – Gel de digestão do polimorfismo CYP1A1 T6235C	16
Figura 8 – Gel de digestão do polimorfismo COMT	18
Figura 9 – Gel de digestão do polimorfismo MPO	21
Figura Suplementar 1 – Ciclo menstrual nas mulheres	35
Figura Suplementar 2 – Ciclo viral do HPV	36
Figura Suplementar 3 – Processos oncogénicos do HPV	36
Figura Suplementar 4 – Curva de calibração para o cálculo da actividade da RTM	39
Figura Suplementar 5 – Curva de calibração para o cálculo da concentração de estradiol ..	40
Figura Suplementar 6 – Sequência de corte da enzima MspI	40
Figura Suplementar 7 – Sequência de corte da enzima NlaIII.....	40
Figura Suplementar 8 – Sequência de corte da enzima SsiI	40
Figura Suplementar 9 –Marcadores de peso molecular de DNA (50 bp e 100 bp).....	40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de PCR necessárias para determinação de cada polimorfismo, bem como as condições de electroforese para observação dos fragmentos amplificados	14
Tabela 2 – Condições de RFLP necessárias para a digestão enzimática de cada sequência amplificada, bem como as condições de electroforese para observação dos fragmentos digeridos	14
Tabela 3 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo CYP1A1 nas três populações estudadas.	16
Tabela 4 – Análise do risco por <i>odds ratio</i> (OR) dos diferentes genótipos e alelos de CYP1A1 para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas.....	17
Tabela 5 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo COMT nas três populações estudadas	18
Tabela 6 – Análise do risco por <i>odds ratio</i> (OR) dos diferentes genótipos e alelos de COMT para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas	19
Tabela 7 – Análise do risco por <i>odds ratio</i> (OR) para as diferentes associações de genótipos COMT/CYP1A1 para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas	20
Tabela 8 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo MPO nas três populações estudadas	21
Tabela 9 – Análise do risco por <i>odds ratio</i> (OR) dos diferentes genótipos e alelos de MPO para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas	22
Tabela 10 – Actividade da actividade da redutase transmembranar de ferricianeto dependente de NADH nas populações em estudo	23
Tabela 11 – Análise descritiva da concentração de E2 circulante nas populações em estudo	23
Tabela Suplementar 1 – Valores para realização da curva de calibração	39

RESUMO

Os leiomiomas são neoplasias benignas que se formam a partir das células do músculo liso. Estes são os tumores mais comuns do aparelho reprodutor feminino. O cancro do colo do útero, cujo agente patogénico é o HPV, é o segundo cancro mais frequente e a segunda maior causa de morte nas mulheres em todo o mundo.

Um dos factores de risco para o desenvolvimento de neoplasias em tecidos sensíveis a hormonas é a exposição, excessiva e cumulativa a estrogénios. Um factor importante da toxicologia dos estrogénios, para além da estimulação da proliferação de células epiteliais, é o seu metabolismo oxidativo. Assim, estudou-se polimorfismos funcionais nas seguintes enzimas: o CYP1A1 (rs4646903), a COMT (rs 4680), a MPO (rs2333227). Estudou-se igualmente a actividade da RTM e a concentração de estradiol circulante.

Neste estudo observou-se que o alelo C, responsável pela maior actividade de CYP1A1, é um factor de risco em ambas as patologias. O alelo A, que concede menor actividade à enzima COMT, apresenta-se como um factor de risco para as patologias em estudo.

Observámos que o genótipo GA da enzima MPO revelou-se um factor de risco em ambas as patologias – isto poderá indicar que esta é importante na eliminação do HPV; ou poderá ser um indício de que quantidades excessivas de ROS são prejudiciais às células transformadas. A RTM não demonstrou resultados estatisticamente significativos.

Os níveis de estradiol circulante foram superiores nas populações patológicas corroborando a teoria que esta hormona é tumorigénica, quer directa quer indirectamente. A maior concentração de estradiol na população de leiomiomas pode indicar uma maior dependência hormonal deste.

O facto dos resultados obtidos serem idênticos nos leiomiomas e cancro do colo do útero é interessante: são dois tumores diferentes, não só na sua etiologia, mas também na sua fisiologia; no entanto, os riscos não se distinguiram, indicando aparência em termos de susceptibilidade.

Palavras-chave: Leiomioma, HPV, COMT, MPO, CYP1A1.

ABSTRACT

Leiomyomas are benign neoplasms that arise from smooth muscle cells. These are the most common tumors of the feminine reproductive system. HPV infection may lead to cervical cancer; this is the second most frequent cancer and the second biggest cause of death in women worldwide.

One risk factor for the development of neoplasms in hormone-sensitive tissue in women is the excessive and cumulative exposure to estrogens. Estrogen toxicology can be explained by its ability to promote proliferation of epithelial cells, but also because of its oxidative metabolism. So, we studied the functional polymorphisms in the following enzymes: CYP1A1 (rs4646903), COMT (rs 4680), and MPO (rs2333227). We also studied the activity of RTM, and the concentration of estradiol.

In this study we observed that the allele C, responsible for a more active CYP1A1, it's a risk factor in both pathologies. The allele A, that codifies a lower activity COMT, also presents itself as a risk factor for both leiomyomas and cervical cancer.

The GA genotype in the MPO enzyme revealed itself as a risk factor for both pathologies – which may indicate that MPO is important in the elimination of HPV from the organism; or that excessive amounts of ROS could lead to apoptosis of tumorigenic cells.

The analysis of RTM activity demonstrated no significant statistical values.

The levels of estradiol in blood were superior on the studied populations, supporting the theory that this hormone is tumorigenic, either acting directly or through its metabolism.

The results obtained through this study demonstrate that both leiomyomas and cervical cancer show similar susceptibilities, even though they are very different from each other: not only in their etiology but also in their physiology.

Key-words: Leiomyoma, HPV, COMT, MPO, CYP1A1.

I – INTRODUÇÃO TEÓRICA

As neoplasias são o resultado de interacções complexas entre o fundo genético e factores ambientais; estas iniciam-se quando uma célula adquire uma mutação que viola o processo normal de crescimento, diferenciação e proliferação na célula. Assim, são o resultado de mutações em genes críticos, que regulam o ciclo celular da célula e que modulam o crescimento e morte celular (Cavalieri *et al.*, 2002; Li *et al.* 2011; Arseniy *et al.*, 2012)

Perceber a origem destas mutações abre a porta a estratégias para controlar e prevenir o cancro. Mesmo as neoplasias com origens e factores de risco ambientais bem conhecidos, têm componentes genéticos importantes na sua etiologia (Garte, 1998; Cavalieri *et al.*, 2002).

Existe uma clara associação entre a exposição excessiva a estrogénios e o desenvolvimento de cancro em tecidos sensíveis a estas hormonas como os da mama e do endométrio. Na verdade, as neoplasias dos tecidos sensíveis a hormonas esteróides sexuais representam mais de 30% de todos os cancros diagnosticados nos homens; nas mulheres corresponde a mais de 40% (Roy *et al.*, 2007; Bolton & Thatcher, 2008).

Existem vários factores de risco para o desenvolvimento de cancro em tecidos sensíveis a hormonas esteróides sexuais, tais como idade precoce da menarca, a nuliparidade, a menopausa tardia, a história familiar de cancro da mama e as terapêuticas de substituição hormonal. Um factor que liga estes dados é a exposição cumulativa aos estrogénios, sugerindo que esta exposição é importante no desenvolvimento de cancro (Yager, 2000).

Os tecidos uterinos são um tecido extremamente sensível às acções das hormonas esteróides sexuais. Durante o ciclo menstrual, as células epiteliais cervicais proliferam e diferenciam-se à medida que os níveis de estrogénios aumentam, resultando em hiperplasias do epitélio sem alterações patológicas (Vadlamuri *et al.*, 1998) – **anexo A.1, figura suplementar 1.**

1- Estrogénios

1.1 – Acções gerais dos estrogénios

Os estrogénios, através dos seus receptores nucleares E_{α} e E_{β} (*estrogen receptor α* , e *estrogen receptor β* , respectivamente), e do seu receptor de membrana GPR30 (*G protein-coupled receptor 30*), influenciam processos fisiológicos em vários tecidos/sistemas tais como: colón, cérebro, osso, sistema cardiovascular, sistema imunitário e aparelho reprodutor feminino. A ligação aos seus receptores activa a expressão de genes-alvo, que codificam para proteínas com funções biológicas importantes. Os estrogénios exercem efeitos biológicos

diversos como o desenvolvimento e diferenciação sexual feminina, vasodilatação arterial, manutenção de densidade óssea, e desempenham acções neuroprotectoras. (Gruber *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2005).

Os estrogénios que ocorrem naturalmente – o 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e o estriol (E3) – são esteróides em C18 derivados de colesterol (Sasaki *et al.*, 2003).

1.2 – Biossíntese e metabolismo dos estrogénios

O metabolismo do estrogénio é complexo, mas pode ser dividido em três etapas importantes: síntese, metabolismo e destoxificação (Khvostova *et al.*, 2012).

O colesterol é catalisado a pregnenolona por CYP11A; por sua vez a pregnenolona irá ser transformada em androgénios pela acção de CYP17. O CYP19 (aromatase), produz estrogénios utilizando os androgénios (Sasaki *et al.*, 2003; Khvostova *et al.*, 2012).

Nas mulheres, os ovários e as glândulas adrenais são a principal fonte de estradiol; no entanto, após a menopausa, o ovário pára de produzir estrogénios e os esteróides circulantes inactivos, como androstenediona, testosterona, e sulfato de estrona, são considerados substratos precursores de produção local de estrogénios – esta característica é comum nos homens (Sasaki *et al.*, 2003).

Os estrogénios são eliminados do organismo através de transformações metabólicas que inactivam os metabolitos estrogénicos; estes são, posteriormente, excretados na urina e nas fezes (Sasaki *et al.*, 2003).

Os esteróides E2 e E1 são metabolizados por duas vias distintas: 16 α -hidroxilação (catalisada pela enzima CYP3A4) e formação de catecol-estrogénios (CE) – o 2-hidroxi-estrogénio e 4-hidroxi-estrogénio (2-OH-CE e 4-OH-CE respectivamente) (Cavalieri *et al.*, 1997).

Na via de formação de CEs, o primeiro passo no metabolismo dos estrogénios, a hidroxilação, é mediada pelas enzimas CYP (citocromo P450). As isoenzimas CYP1A1 e CYP1B1 catalisam, respectivamente a hidroxilação na posição 2 e 4 de E1 e E2, formando os CEs (Sasaki *et al.*, 2003; Bolton & Thatcher, 2008).

Em geral, os CEs são inactivados por reacções de conjugação como a glucoronidação e sulfatação. A via mais comum de conjugação em tecidos extra-hepáticos ocorre por O-metilação, catalisada pela enzima ubíqua catecol-O-metil-transferase (COMT) (Cavalieri, 2002; Khvostova *et al.*, 2012).

A COMT é uma enzima de segunda fase do metabolismo; catalisa a O-metilação tanto do 2-OH-CE e 4-OH-CE formadas pelo metabolismo de E2 e E1 endógenos, formando 2-

metoxi-estradiol (2-Me-O-E2), e 4-metoxi-estradiol (4-Me-O-E2), respectivamente. A O-metilação de CEs inactiva o seu potencial estrogénico e bloqueia a sua capacidade de sofrerem oxidações sucessivas para semi-quinonas e quinonas (CE-Q) que conseguem formar aductos no DNA e/ou participar no ciclo de redox para produzir espécies reactivas de oxigénio (Yager, 2000).

Assim, a oxidação catalítica de CEs a CE-Q é competitiva com a sua O-metilação. As CE-Q, por sua vez, podem ser neutralizadas por conjugação com glutathione (GSH). Uma segunda via de inactivação destas é a sua redução a CEs pela quinona redutase e/ou citocromo P450 redutase (Cavalieri *et al.*, 2002).

1.3 – Relação entre tumorigénese e estrogénios

Tornou-se claro que existem vários mecanismos que se interligam na carcinogénese estrogénica. Um dos maiores factores de risco para o desenvolvimento de cancro da mama em mulheres é a exposição, excessiva e cumulativa a estrogénios. Assim, a contribuição dos estrogénios para a tumorigénese é a estimulação da proliferação das células epiteliais – denominado o paradigma da carcinogénese dos estrogénios. No entanto, um factor importante da toxicologia dos estrogénios é o seu metabolismo oxidativo celular tecido-específico, realizado por diferentes isoformas específicas do citocromo P450 e peroxidases. Estes metabolitos oxidativos podem contribuir para a carcinogénese do estrogénio (Yager, 2000; Bolton & Thatcher, 2008; Martínez-Ramírez *et al.*, 2013).

Dos vários metabolitos formados durante a biotransformação e eliminação do estrogénio, alguns têm acções estrogénicas, e outros podem ser protectores através das suas propriedades antioxidantes e/ou actividade de inibição de crescimento celular e da angiogénese (Yager, 2000) – **figura 1**.

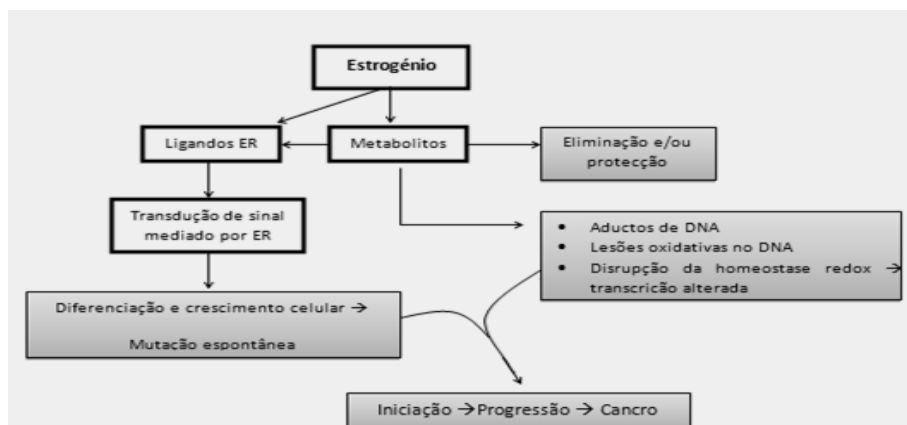


Figura 1- Paradigma clássico e moderno dos efeitos tumorigénicos dos estrogénios. O paradigma clássico dos estrogénios afirma que estes, ao afectarem a taxa de crescimento e proliferação de certos tecidos aumentam o risco de cancro, devido à susceptibilidade a erros genéticos na replicação do DNA; no entanto, embora este mecanismo possa ser importante no processo de carcinogénese, existem evidências que os estrogénios poderão influenciar este processo por outras vias, especificamente, as lesões nocivas que os seus metabolitos provocam, quer directamente, quer através de processos metabólicos que sofrem (adaptado de Yager, 2000).

Os CE são, eles próprios, moléculas sinalizadoras que funcionam através dos ER. Estes metabolitos podem ser inactivados pela acção da COMT através da O-metilação; no entanto, se esta reacção não ocorrer, os CE poderão ser oxidados por, virtualmente, qualquer enzima oxidativa ou ião metálico dando origem a quinonas de catecol de estrogénio (CE-Q). As quinonas são carcinogénicas, podendo causar lesões nas células por alquilação e/ou oxidação das proteínas celulares e DNA em vários tecidos; sofrem processos redox cíclicos que produzem espécies reactivas de oxigénio (ROS) e podem ligar-se covalentemente às bases do DNA e a locais nucleofílicos das proteínas para formar aductos. O stress oxidativo é uma ameaça constante a organismos aeróbicos, sendo gerados durante fosforilação oxidativa mitocondrial, bem como durante inflamação, infecção, entre outros (Yager, 2000; Tsuchiya *et al.*, 2005; Bolton & Thatcher, 2008; Martínez-Ramírez *et al.*, 2013).

Estes compostos derivados do metabolismo oxidativo que, em situações fisiológicas se encontram em baixas concentrações, são necessários para determinados processos celulares, incluindo transdução de sinal, activação enzimática, expressão génica e controlo da actividade da caspase que é activada durante o mecanismo apoptótico (De Marco, 2013).

As lesões que os ROS podem causar na célula não dependem apenas da sua concentração intracelular, mas também no equilíbrio entre estes e as espécies antioxidantes endógenas. Quando se perde o equilíbrio oxidante/antioxidante, gera-se stress oxidativo, alterando e lesionando várias moléculas, incluindo DNA, RNA, lípidos e proteínas (Sosa *et al.*, 2013).

Para além da produção de ROS através do seu metabolismo, E2 é também imunomoduladora. Assim, a níveis fisiológicos, E2 induz interleucina-1 (IL-1), uma citocina que inicia uma cascata de outras citocinas, factores de crescimento e factores quimiotácticos. Estes últimos causam infiltração de fagócitos, que podem ser activados, secretando um conjunto de outras citocinas, ROS e espécies reactivas de azoto (RNS). Por outro lado, o E2 inibe a produção de IL-6 induzido por IL-1. Assim, ao suprimir a produção de IL-6, o E2 aumenta a proliferação de células epiteliais, enquanto inibe a actividade das células *natural killer*, permitindo, assim, o crescimento do tumor. Os estrogénios também afectam a função dos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que produzem grandes quantidades de ROS quando estimulados. Estas células exprimem a enzima mieloperoxidase (MPO), que catalisa a oxidação de íões cloreto por H_2O_2 (gerado pela NADH oxidase) a ácido hipocloroso (HOCL/OCL⁻), um potente oxidante. O estrogénio, e os seus metabolitos, podem induzir a libertação de MPO de células não activadas e estimular a produção de ROS na ausência de agentes patogénicos. (Cavalieri *et al.*, 2000; Roy *et al.*, 2007) – **figura 2**.

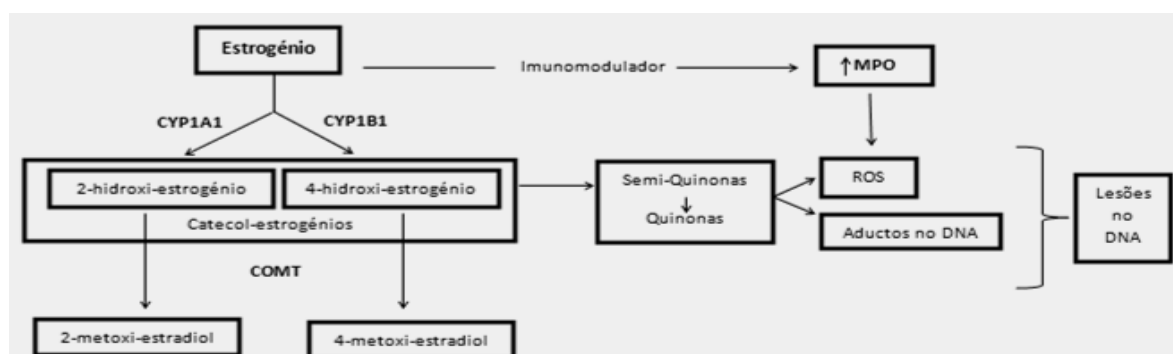


Figura 2 - Relação entre o metabolismo dos estrogénios e tumorigénese. Os estrogénios podem ser metabolizados por duas vias: a 16 α -hidroxilação (catalisada por CYP3A4 – via não representada), e a formação de catecol-estrogénios. CYP1A1 catalisa a formação de 2-OH-CE a partir do estrogénio, e CYP1B1 a formação de 4-OH-CE. Os CE podem ser O-metilados pela COMT, tornando-se menos deletérios para o organismo; podem sofrer oxidações a semi-quinonas e quinonas, que podem formar aductos no DNA (estáveis e instáveis) ou entrarem em ciclos de redox que produzem ROS. Os estrogénios são, por sua vez, imunomoduladores, aumentando a actividade da MPO, irão aumentar o nível de ROS pela produção de HOCL.

2 – Tumores Ginecológicos

2.1 – Leiomiomas

2.1.1 – Etiopatogenia e epidemiologia

Leiomiomas são neoplasias benignas que se formam a partir das células do músculo liso, afectando 22% das mulheres durante a sua vida (Herr *et al.*, 2006; Blake, 2007).

Embora os leiomiomas sejam prevalentes no útero, estes podem desenvolver-se noutros locais do corpo, como no trato gastrointestinal ou nas paredes das artérias (*leiomiomatosis* intravenosa). No útero, estes podem crescer no miométrio (leiomiomas intramurais ou intersticiais), projectarem-se através da camada serosa do útero na cavidade peritoneal (leiomiomas pedunculares e subserosos), ou protuberar na cavidade uterina (leiomiomas submucosos). São tipicamente bem diferenciados e têm um índice mitótico relativamente baixo, retendo o fenótipo de músculo liso (Walker, 2002; Blake, 2007).

Os leiomiomas são a neoplasia mais comum do aparelho reprodutor feminino, apresentando sintomas tais como dismenorreia, menorragia, infertilidade e morbilidades várias, sendo a principal causa de histerectomia em mulheres na pré-menopausa (Houston *et al.*, 2001, Walker, 2002).

2.1.2 – Relação entre leiomiomas e estrogénios

O crescimento de leiomiomas está associado a E2. A dependência hormonal deste tumor é corroborada pelo facto de serem diagnosticados nas idades reprodutivas, aumentarem de tamanho na gravidez e regredirem na menopausa – acontecimentos que coincidem com alterações hormonais. Também se observou que os agonistas da hormona libertadora de gonadotropina (GnRH), que interferem com o eixo hipotálamo-hipófise, impedem o crescimento do tumor através da indução de um ambiente hipo-estrogénico. Foi observado que a maior parte das células musculares que contribuem para o leiomioma expressam os receptores $Er\alpha$ e $Er\beta$, apresentando igualmente uma maior concentração de E2 (Houston *et al.*, 2001).

Vários estudos epidemiológicos permitem retirar algumas conclusões acerca de factores de risco, como a obesidade, a idade e a exposição a estrogénios. A obesidade aumenta o nível de estrogénios circulantes através de aromatização periférica; o início de menarca numa idade precoce aumenta a exposição a estrogénios (Houston *et al.*, 2001; Walker, 2002; Rylander-rudqvist *et al.*, 2004).

2.2 – Cancro do colo do útero

2.2.1 – Etiopatogenia e epidemiologia

A infecção por papiloma vírus humano (HPV) causa, virtualmente, todos os cancros do colo do útero, bem como uma pequena fracção de cancro vaginal, vulvar, anal, peniano, assim como cancros de cabeça e pescoço. Este vírus tem uma transmissão sexual. A maioria das mulheres infectadas não desenvolve doença; assim o vírus é essencial para o desenvolvimento da doença, mas não suficiente (Schiffman & Kjaer, 2003).

O cancro do colo do útero é o segundo cancro mais frequente e a segunda maior causa de morte nas mulheres em todo o mundo. A grande mortalidade é o resultado da falta de eficácia nas terapias para eliminar a doença em mulheres com cancro do colo do útero de grande risco e a falta de resposta à quimioterapia na doença inoperável (Chung *et al.*, 2011).

2.2.2 – HPV

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou a infecção por HPV como carcinogénica para humanos quando se trata dos HPV tipos 16 e 18, “provavelmente carcinogénica” quando a infecção é causada por HPV tipos 31 e 33; os HPV 6 e HPV 11, por outro lado, são responsáveis por 90% de verrugas genitais (Franco *et al.*, 2001; Moody & Laimins, 2010; Crosbie *et al.*, 2013).

O HPV pertence à família dos papiloma vírus, e o seu genoma consiste num DNA circular de 8000 bp, que se encontra numa cápside proteica composta por duas moléculas (L1 e L2). O genoma codifica para estas duas proteínas, e para mais seis proteínas precoces (E1, E2, E4-E7) que são necessárias para a replicação viral do DNA e para a produção de novas partículas virais na célula infectada (Muñoz *et al.*, 2006).

Estes vírus estão perfeitamente adaptados aos tecidos que infectam; o HPV costuma provocar cancro em zonas denominadas de “zonas de transformação”. Esta é a zona onde um determinado epitélio contacta e gradualmente substitui outro – num processo denominado metaplasia. O cérvix, ânus e amígdalas são exemplos de tecidos com epitélios que poderão sofrer carcinogénese por infecção HPV (Muñoz *et al.*, 2006; Moody & Laimins, 2010).

2.2.2.1 – O ciclo viral

O ciclo viral inicia-se quando partículas infecciosas alcançam os queratinócitos da camada basal do epitélio entrando nestas células através de pequenas lesões com fissura. Após a entrada do vírus na célula, o genoma viral desloca-se para o núcleo hospedeiro, onde se encontra como episomas de baixa expressão. Este é replicado até atingir um valor basal, e mantido neste valor baixo durante um período de tempo; ocorre igualmente, a produção de proteínas precoces, essenciais para esta fase (Muñoz *et al.*, 2006; Moody & Laimins, 2010).

As células basais afastam-se, eventualmente, da camada basal, movimentando-se para a superfície do epitélio, e iniciam o programa de diferenciação terminal. Este fenómeno induz a fase produtiva do ciclo viral, onde ocorre a produção das proteínas tardias do vírus. O HPV replica-se neste compartimento, e, após a formação de novos viriões, aproveita-se da descamação natural das camadas superficiais para ser libertado no ambiente, podendo

reiniciar o processo de infecção (Muñoz *et al.*, 2006; Moody & Laimins, 2010) – **anexo A.2, figura suplementar 2.**

As moléculas críticas para a replicação viral são as proteínas E6 e E7, que interagem com várias moléculas celulares do hospedeiro. Estas interações demonstraram aumentar a proliferação, eventual imortalização e transformação maligna das células. A ligação de E7 a pRB (proteína retinoblastoma – anti-cancerígena) activa o factor de transcrição E2F, o que leva à expressão de proteínas necessárias para a replicação de DNA, levando a célula a fase de síntese não planeada (Fase S) – ocorrendo a transcrição de DNA do vírus. A fase S não prevista levaria, normalmente, a apoptose por p53 (proteína que regula o ciclo celular e o processo normal de apoptose); no entanto, em células infectadas por HPV este processo é impedido pela proteína viral E6, que marca p53 para degradação proteica. Como consequência, o controlo do ciclo celular é destruído e a diferenciação dos queratinócitos é atrasada. A capacidade do HPV oncogénico de induzir transformação maligna pode ser explicada pela instabilidade genómica, acumulação de mutações nos oncogenes, maior perda de controlo celular e eventualmente, imortalidade das células mutadas (Muñoz *et al.*, 2006; Moody & Laimins, 2010).

2.2.2.2 – Progressão da doença

O cancro do colo do útero inicia-se lentamente – normalmente é estabelecido uma década após a infecção com HPV, e só se desenvolve em mulheres cujas lesões não se curam espontaneamente, isto é, lesões persistentes (Chung *et al.*, 2011; Crow, 2012).

O cancro do colo do útero desenvolve-se em 4 passos: transmissão de HPV, persistência viral, progressão de um clone de células persistentemente infectadas a pré-cancro e invasão. Pode ocorrer depuração da infecção por HPV, ou mesmo uma regressão das lesões pré-cancerígenas (Crosbie *et al.*, 2013).

A grande probabilidade de eliminação espontânea de infecção por HPV, bem como a possibilidade de regressão das lesões benignas, leva a crer que a susceptibilidade individual deverá ter um peso importante (Au, 2003; Chung *et al.*, 2011) – **Anexo A.3, figura suplementar 3.**

2.2.3 – Interacção entre estrogénios e HPV

As consequências celulares da ligação de estrogénios aos seus receptores incluem alteração da adesão celular e migração, aumento da proliferação celular e resistência a apoptose induzida por drogas (Au *et al.*, 2007).

Os esteróides podem ligar-se a sequências específicas do DNA nas regiões regulatórias transcricionais do DNA do HPV, aumentando ou diminuindo a transcrição de vários genes. Assim, o estrogénio pode influenciar a URR (*upstream regulatory region*) do HPV, que controla a transcrição de E6/E7, activando a transcrição destas proteínas, e, aumentando assim, o potencial de tumorigénese do vírus (Kim *et al.*, 2000, Moodley *et al.*, 2003) – **figura 3.**

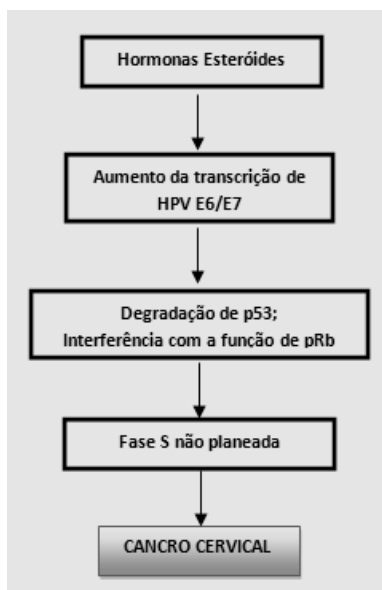


Figura 3 – Interação proposta para a relação entre estrogénio e HPV E6/E7, que resulta em cancro do colo do útero (adaptado de Moodley *et al.*, 2003).

E6 promove a degradação de p53 que é responsável pela manutenção do ciclo celular e apoptose. Por outro lado, E7 liga-se a pRb, impedindo-o de se ligar ao factor de transcrição E2F – este irá, assim, promover o avanço da célula para uma fase de síntese não planeada. O ciclo celular fica desregulado; a célula perde o controlo sobre a apoptose, e começa a produzir as proteínas essenciais à reprodução viral (Kim *et al.*, 2000; Moodley *et al.*, 2003).

A evidência da influência de estrogénio na progressão tumoral provocada por HPV pode ser observadas nos estudos epidemiológicos que demonstram aumento de risco para mulheres com alta paridade – este facto poderá estar associado à alteração das hormonas esteróides sexuais durante a gravidez. (Chung *et al.*, 2011).

3 – Polimorfismos funcionais em estudo

3.1 – Citocromo P450

O sistema de citocromos P450 (CYP) é uma família de enzimas contendo heme, multi-génicas, que catalisam o metabolismo de substratos endógenos e exógenos, como ácidos gordos, esteróis, esteróides sexuais, glucocorticóides, vitamina D, leucotrienos, prostanglandinas e metabolitos da vitamina A. Desempenham, assim, um papel chave no metabolismo de xenobióticos no organismo (Barão *et al.*, 2010).

3.1.1 – Citocromo P450 1A1 (CYP1A1)

O gene humano CYP1A1 está localizado no braço longo do cromossoma 15 (15q22-q24) e estende-se por 7 exões (Paraskevaidis *et al.*, 1998) – **figura 4**.

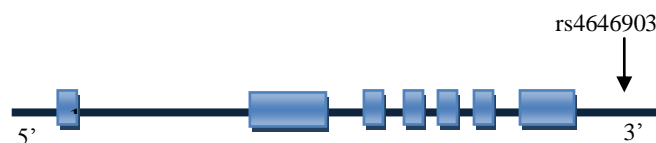


Figura 4 – Representação do gene de CYP1A1. Os blocos representam os exões.

O papel de CYP1A1 como enzima chave na metabolização de PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), como o benzopireno do fumo do tabaco, está bem estabelecido. Os produtos gerados através desta via podem formar aductos com DNA e proteínas celulares, o que pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (Vadlamuri *et al.*, 1998).

O primeiro polimorfismo descoberto (denominado m1 - rs4646903) é uma transição T-C situada na posição 6235 criando um local de restrição adicional para a enzima MspI na região flanqueadora 3' – este alelo aumenta significativamente a actividade enzimática induzível comparada com o tipo selvagem (Paraskevaidis *et al.*, 1998; Tsuchiya, 2005; Barão *et al.*, 2010).

3.2 – Catecol-O-metil-transferase (COMT)

O gene COMT está localizado no braço longo do cromossoma 22 (22q11.2), e consiste em seis exões; o exão um e dois são não codificantes. Esta enzima apresenta duas isoformas: uma ligada à membrana e outra solúvel. Estas isoformas são codificadas pelo mesmo gene, com inícios de transcrição diferentes (Hirata *et al.*, 2008) – **figura 5**.

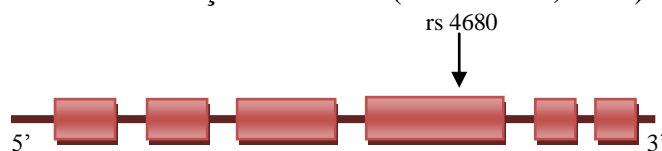


Figura 5 – Representação do gene da COMT. Os blocos representam exões.

O gene COMT codifica para a enzima catecol-O-metil-transferase, que converte, como mencionado, CEs a metabolitos menos activos, através da O-metilação, ocorrendo a transferência de um grupo de metil da S-adenosil-metionina (SAM) para as catecolaminas. É uma enzima de fase II, e catalisa a metilação de CEs para formar 2-metoxi-estradiol (2-Me-O-E2) e 4-metoxi-estradiol (4-Me-O-E2), a partir de 2-hidroxi-estrogénio e 4-hidroxi-estrogénio, respectivamente (Gooden *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2008; Hirata *et al.*, 2008).

O gene COMT apresenta um polimorfismo funcional G-A no codão 158 (rs 4680), no exão 4, resultando numa modificação de valina para metionina. Esta transição resulta numa diminuição da actividade enzimática, e distingue o alelo com alta actividade (COMT-H) e o de baixa actividade (COMT-L) (De Oliveira, *et al.*, 2008; Hirata, *et al.*, 2008).

3.3 – Mieloperoxidase (MPO)

O gene da MPO encontra-se no braço longo do cromossoma 17 (17q23.1) e consiste em 12 exões (Kiyohara *et al.*, 2005; Arseniy *et al.*, 2012) – **figura 6**.



Figura 6 – Respresentação do gene da MPO. Os blocos representam exões.

A MPO é uma enzima lisossômica de fase 1, e é expressa predominantemente pelos PMN reactivos e, em menos quantidade por monócitos e macrófagos, nos locais de inflamação, durante a fagocitose (Lau & Baldus 2006; Rudolph *et al.*, 2009; Pabalan *et al.*, 2012; Qin X *et al.*, 2013).

Após activação, o papel de MPO é catalisar a reacção entre peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e anião cloreto (Cl^-), gerando ácido hipocloroso ($HOCl$) e outros ROS, que participam na “explosão” oxidativa durante a resposta imune inata (Lau & Baldu, 2006; Li *et al.*, 2011; Arseniy *et al.*, 2012).

Quantidades excessivas de $HOCl$ levam a modificação oxidativa de bases de DNA. Os produtos colaterais de MPO podem, igualmente, inibir mecanismos de reparação de DNA (Lau & Baldus, 2006; Arseniy *et al.*, 2012).

Existe um SNP, uma transição G-A no codão 463 (rs2333227), na região promotora do gene, onde se liga o factor de transcrição SP1 (*specificity protein*). O alelo comum eleva a actividade transcripcional de MPO, através da promoção da ligação de SP1, enquanto o alelo A confere uma activação transcripcional 25 vezes inferior (He *et al.*, 2009; Pabalan *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2013).

4- Redutase Transmembranar dos eritrócitos

A redutase transmembranar (RTM) é componente de um sistema redox transmembranar presente em todas as células, observando-se nos eritrócitos as actividades mais elevadas. Esta enzima glicoproteica reduz o anião ferricianeto de potássio extracelular, na dependência do NADH produzido pela glicólise; parecendo estar envolvida nos processos de controlo de stress oxidativo, metabolismo glicolítico, bem como nos processos de apoptose e envelhecimento celular (Wang *et al.*, 1980; May *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2006).

A redutase transmembranar transfere electrões do NADH intracelular do metabolismo glicolítico para oxidantes externos não permeantes como o ferricianeto (Marques & Bicho, 1997).

A RTM poderá estar associada a locais específicos (receptores) para a ligação de

hormonas, sugerindo uma ligação entre o sistema redox e o sistema hormonal; assim, após estímulo hormonal, ocorrem respostas antioxidantes e anti-apoptóticas. No eritrócito, a RTM poderá ser activada pela acção dos estrogénios (E1 e E2) e dos CEs (Marques & Bicho, 1997; Gruber *et al.*, 2002).

II – Objectivos

Este estudo tem como objectivo estudar polimorfismos funcionais nas enzimas COMT e CYP1A1, associados ao metabolismo dos estrogénios, bem como da MPO, para observar o seu efeito na susceptibilidade de mulheres ao cancro do colo do útero e leiomiomas.

Pretende-se, igualmente, observar a actividade da redutase transmembranar dos eritrócitos, uma enzima envolvida em processos anti-apoptóticos, assim como se se observa uma relação com o estradiol circulante no sangue, e risco o das doenças em estudo.

III – Materiais e métodos

1- Descrição da População

Para a realização do estudo foram estudados três grupos de mulheres: dois grupos patológicos – um correspondente ao cancro do colo do útero e outro aos leiomiomas; e um grupo controlo para ambas as patologias.

O grupo controlo foi fornecido pela Faculdade de Motricidade Humana do estudo “Mexa-se Mais” pelo Professor Luis Sardinha, consistindo em 175 mulheres que não apresentavam qualquer das patologias em estudo, e com intervalo de idades entre os 18 e os 79 com a mediana de 54 anos. O grupo patológico “Leiomiomas” corresponde a 190 mulheres que recorreram ao serviço de Radiologia de Intervenção do Hospital Saint Louis em Lisboa, com idades entre 24 e 57 anos, correspondendo a uma mediana de 40 anos. Estas amostras foram disponibilizadas pelo Director Professor Doutor João Pisco. O grupo “cancro do colo do útero” corresponde a 120 mulheres com patologia do colo do útero, resultante da infecção por HPV, provenientes do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPOFG) delegações de Lisboa (disponibilizadas pela Professora Doutora Maria Clara Bicho) e do Porto (disponibilizadas pelo Professor Doutor Rui Medeiros). O intervalo de idades situa-se entre os 19 e 81 anos, com uma mediana de 44 anos.

2 - Extração de DNA

Após a colheita de sangue, este foi armazenado com EDTA a -20 °C. A extracção de DNA foi realizada pelo método não enzimático de *salting out* adaptado do método de Lahiri & Nurnberguer Jr. (Lahiri & Nurnberger, 1991) – **anexo B.1**.

3 - Quantificação de DNA

Utilizou-se um espectrofotómetro de espectro completo (NanoDrop® ND-2000) para quantificar o DNA extraído (ng/μL) e determinar a sua pureza – através da razão entre absorvências 260/280 e 230/260.

4 - Amplificação de DNA

Recorreu-se à técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para amplificar o DNA. PCR trata-se de uma técnica que recorre à alternância cíclica de temperaturas específicas. Primeiro ocorre a desnaturação da cadeia de DNA; posteriormente ocorre o emparelhamento dos *primers*, num processo designado *annealing*. Depois, ocorre a formação da dupla cadeia de DNA através da acção da Taq polimerase, que sintetiza a cadeia complementar. Utilizou-se o termociclador GeneAmp® PCR System 2700 com diferentes condições como descrito na **Tabela 1**.

Foi efectuado *hotstart* a 94°C durante 2min e ao fim dos 35 ciclos ocorreu a extensão final a 72°C durante 7min (o polimorfismo CYP1A1 não requer extensão final). Após a amplificação recorreu-se à electroforese em gel de agarose (SeaKem® LE Agarose) em tampão TAE (200 mM Tris-Acetato, 10 mM EDTA, pH 8); com brometo de etídio (5 mg/mL), para visualização dos fragmentos amplificados sob luz UV.

Tabela 1- Condições de PCR necessárias para determinação de cada polimorfismo, bem como as condições de electroforese para observação dos fragmentos amplificados (o V corresponde à voltagem, em volts, e o T ao tempo que a electroforese durou, expresso em minutos).

Gene	Primers	Condições de PCR	Componentes	Condições de electroforese		
				% Agarose	V	T
CYP1A1	5'-CCTTCTTGCTGGCACCCCAT-3'	35 ciclos Desnaturação: 30s a 94°C Annealing: 30s a 58°C Extensão: 75s a 72°C	DNA:200ng Primers 1: 10 pmol Primers 2: 10 pmol Taq: 1U MgCl: 25mM PCR nucleotide mix: 0.2mM Volume final: 50µL	2	80v	60
	5'-GGAAGTCCAAAACCTCGCACCA-3'					
COMT	5'-GGCTCATCACCATCGAGATCAA-3'	35 ciclos Desnaturação: 45s a 94°C Annealing: 45s a 60°C Extensão: 60s a 72°C		3	80v	30
	5'-CCAGGTCTTGACAACGGGTCA-3'					
MPO	5'-GTATAGGCACACAATGGTGAG-3'	35 ciclos Desnaturação: 60s a 94°C Annealing: 60s a 59°C Extensão: 60s a 72°C		2	80v	30
	5'-GCAATGGTTCAAGCGATTCTTC-3'					

5 - Genotipagem

Utilizou-se a técnica de RFLP (*Restriction Frangment Length Polymorphism*) para a genotipagem dos polimorfismos em estudo. Esta técnica utiliza a especificidade das enzimas de restrição para identificar os alelos divergentes; obtendo-se, assim diferentes bandas através de electroforese, conforme o genótipo apresentado pelo indivíduo. A restrição foi efectuada nas condições descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2- Condições de RFLP necessárias para a digestão enzimática de cada sequência amplificada, bem como as condições de electroforese para observação dos fragmentos digeridos.

Gene	Componentes (Thermo Scientific®)	Condições de restrição	Genótipos	Condições de electroforese		
				% Agarose	V	T
CYP1A1-M1	Produto de PCR: 20 µL Enzima: MspI	16 h a 37°C	TT = 899 bp	3	80v	60

	(5U/ μ L) 0.6 μ L <u>Tampão R⁺</u> 5 μ L <u>Água</u> até 50 μ L		<u>TC</u> – 899 bp, 693 bp, 206 bp <u>CC</u> – 693 bp, 206bp			
COMT	<u>Produto de PCR:</u> 20 μ L <u>Enzima:</u> NlaIII (5U/ μ L) 0.6 μ L <u>Tampão R⁺</u> 5 μ L <u>Água</u> até 50 μ L	18 h a 37°C 20 min a 65°C	<u>GG-</u> 111bp, 89 pb <u>GA-</u> 111 bp, 89 bp, 71 bp <u>AA-</u> 71 bp	4	85v	90
MPO	<u>Produto de PCR:</u> 20 μ L <u>Enzima:</u> SsiI (5U/ μ L) 0.8 μ L <u>Tampão O:</u> 2 μ L	16 h a 37°C	<u>GG-</u> 169bp, 120 bp, 61 bp <u>GA-</u> 289 bp, 169bp, 120 bp, 61 bp <u>AA-</u> 289 bp, 61 bp	3	85v	90

A visualização dos produtos de amplificação e restrição foi efectuada num transiluminador de ultravioleta (GenoSmart VWR[®]).

6 – Determinação da actividade da Redutase Transmembranar Eritrocitária

A determinação da actividade da RTM é conseguida através de uma centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos (4°C), separando-se o plasma dos restantes componentes do sangue; posteriormente realizam-se mais três centrifugações nas mesmas condições anteriores, lavando com NaCl 0.9% (v/v), para, no final das lavagens/centrifugações, se obter apenas os eritrócitos. De seguida, realizou-se o protocolo "Actividade da Redutase Transmembranar" (adaptado de Marques F., *et al.*, 1997) - **Anexo B.2.**

7 – Determinação de 17 β -estradiol (E2)

A determinação de estradiol através de plasma foi realizada utilizando o kit de ELISA “Assay Estradiol” de “R&D Systems” – **Anexo B.3.**

8 – Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi efectuada no software IBM SPSS Statistics 20 bem como no Primer of Biostatistics. Na análise dos genótipos (dados discretos) utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) de *Pearson* para saber se as populações se encontravam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE), e se existiam diferenças estatisticamente significativas entre a população controlo e as populações patológicas. Para a determinação da actividade da redutase transmembranar e da concentração de E2 no plasma (dados contínuos) realizam-se testes de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* para todas as populações, procedendo-se posteriormente a um *T-test* para avaliar as diferenças entre as amostras populacionais.

IV – Resultados

1 – Análise do polimorfismo CYP1A1

Após a amplificação e digestão dos fragmentos, efectua-se a electroforese e observam-se os produtos de digestão (**figura 7**). No **anexo C.1, figura suplementar 5** podemos observar a sequência de corte da enzima MspI.

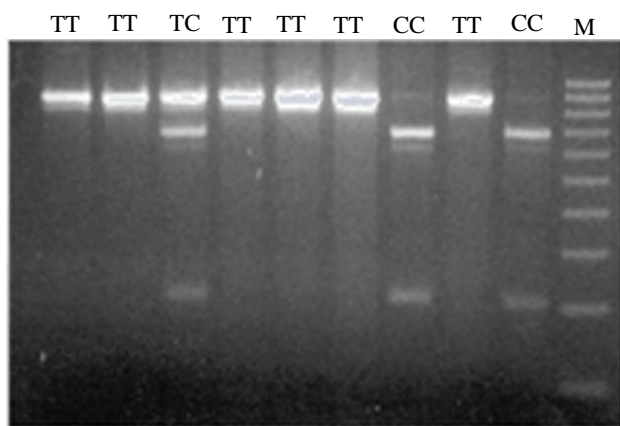


Figura 7 – Gel de digestão do polimorfismo CYP1A1. Podemos observar os 3 polimorfismos com bandas distintas e o marcador de peso molecular 100 bp, no poço da direita, indicado por M (anexo C.2, figura suplementar 8). O polimorfismo TT é caracterizado por uma banda não digerida de 899 bp. O polimorfismo CC, por outro lado, apresenta duas bandas de 693 bp e 206 bp. O polimorfismo TC apresenta as três bandas: 899 bp, 693 bp e 206 bp

Utilizando os genótipos esperados, caso a população estivesse em HWE, podemos realizar uma análise estatística de χ^2 de *Pearson* entre os valores esperados e observados para podermos averiguar se a população se encontra em HWE. Assim, verificou-se que as três populações em estudo encontram-se em HWE ($\chi^2=0,36$, $p=0,549$, na população controlo; $\chi^2=0,11$, $p=0,740$ na população leiomiomas; $\chi^2=0,01$, $p=0,920$ na população cancro do colo do útero). Na **tabela 3** podemos observar a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo CYP1A1 na população de leiomiomas, controlo e cancro do colo do útero, bem como os valores de p obtidos através do teste estatístico χ^2 de *Pearson*, utilizado para comparar as populações patológicas com a controlo.

Tabela 3- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo CYP1A1 nas três populações estudadas.

	TT (%)	TC (%)	CC (%)	Total (%)	p^a	T (%)	C (%)	p^b
Controlo	99 (80,5%)	22 (17,9%)	2 (1,6%)	123 (100%)	—	220 (89,4%)	26 (10,6%)	—
Leiomiomas	74 (64,9%)	35 (30,7%)	5 (4,4%)	114 (100%)	0,023	183 (80,3%)	45 (19,7%)	0,008
Cancro do colo do útero	64 (60,4%)	37 (34,9%)	5 (4,7%)	106 (100%)	0,003	165 (77,8%)	47 (22,2%)	0,001

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0,05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0,05

Como os valores de p, obtidos pelo teste estatístico χ^2 de *Pearson* são inferiores a 0,05 rejeita-se a hipótese nula (as populações são semelhantes); logo, as populações patológicas

apresentam diferenças significativas. Na verdade, podemos observar que a distribuição genotípica e alélica é muito distinta entre as populações. Como tal, torna-se importante realizar uma análise de risco por *odds ratio* para se verificar se existe uma maior correlação entre polimorfismo/alelo e risco de doença. A **tabela 4** apresenta a associação entre os polimorfismos e cancro do colo do útero e leiomiomas, com o correspondente valor de *odds ratio*.

Tabela 4 – Análise do risco por *odds ratio* (OR) dos diferentes genótipos e alelos de CYP1A1 para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas.

Leiomiomas			
Genótipo	OR	IC 95%	p-value
TT	0,448	0,245-0,808	0,007*
TC	2,034	1,106-3,740	0,021*
CC	2,775	0,528-14,598	0,210
T	0,481	0,285-0,809	0,005*
C	2,081	1,236-3,504	0,005*
Cancro do colo do útero			
TT	0,369	0,204-0,668	0,01*
TC	2,462	1,338-4,531	0,03*
CC	2,995	0,569-15,767	0,175
T	0,415	0,247-0,698	0,001*
C	2,410	1,433-4,053	0,001*

*significativo para $p < 0,05$

Podemos observar na tabela que ambas as população apresentam o alelo C como factor de risco para as patologias em estudo: OR=2,081; IC (95%) = 1,236-3,504; $p = 0,005$ para o leiomioma e OR=2,410; IC (95%) = 1,433 – 4,053; $p = 0,001$ para o cancro do colo do útero; o alelo T apresenta-se, assim, como protector na duas patologias. O genótipo TT apresenta uma faceta protectora em relação aos leiomiomas e cancro do colo do útero: OR=0,448; IC (95%) = 0,245-0,808; $p = 0,007$, OR=0,369; IC (95%) = 0,204 – 0,668; $p = 0,01$ respectivamente. . O genótipo TC apresenta valores de risco alto para as duas populações patológicas (OR=2,034; IC (95%) = 1,106 – 3,740; $p = 0,021$ para os leiomiomas, OR=2,462; IC (95%) = 1,338 – 4,531; $p = 0,03$ para o cancro do colo do útero).

2 - Análise do polimorfismo COMT

Através da electroforese, podemos observar o resultado da digestão dos fragmentos amplificados, tal como demonstrado na **figura 8**. No **anexo C.1, figura suplementar 6** podemos observar a sequência de corte da enzima NlaIII.

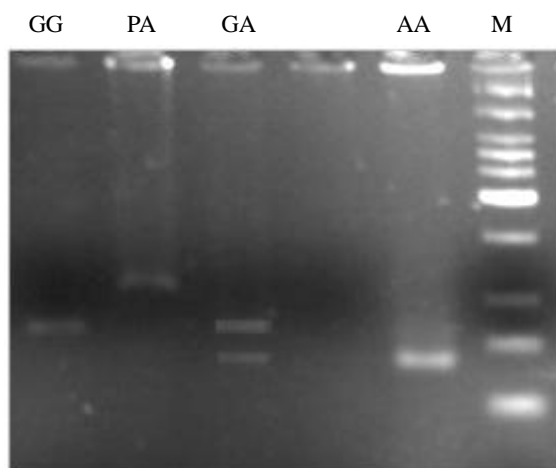


Figura 8 – Gel de digestão do polimorfismo COMT. Podemos observar os 3 polimorfismos com bandas distintas e o marcador de peso molecular 50 bp, no poço da direita, indicado por M (Anexo C.2, figura suplementar 8). O polimorfismo GG é caracterizado por uma banda não digerida de 89 bp. O polimorfismo AA, por outro lado, apresenta uma banda de 71 bp. O genótipo GA apresenta duas bandas, 89 bp e 71 bp. PA representa o produto COMT amplificado (111bp).

Utilizando o teste estatístico χ^2 de *Pearson* podemos averiguar se existem diferenças significativas entre os genótipos esperados se a população estivesse em HWE, e os observados. As populações controlo e leiomiomas encontram-se em HWE ($\chi^2=0,08$, $p=0,777$ e $\chi^2=0,93$, $p=0,335$, respectivamente), tal não se verifica na população cancro do colo do útero ($\chi^2=13,51$ e $p=0,0002$). Na **tabela 5** podemos observar as frequências genotípicas e alélicas de cada polimorfismo em cada população. Podemos igualmente observar os valores de p^a e p^b , obtidos através de uma análise χ^2 de *Pearson*, que compara as populações cancro do colo do útero e controlo, e a população leiomiomas e controlo, para verificar se existem diferenças significativas entre estas.

Tabela 5- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo COMT nas três populações estudadas.

	GG (%)	GA (%)	AA (%)	Total (%)	p^a	G (%)	A (%)	p^b
Controlo	79 (50,6%)	63 (40,4%)	14 (9%)	156 (100%)	—	221 (70,8%)	91 (29,2%)	—
Leiomiomas	39 (33,1%)	62 (52,5%)	17 (14,4%)	118 (100%)	0,013	140 (59,3%)	96 (40,7%)	0,006
Cancro do colo do útero	48 (44%)	34 (31,2%)	27 (24,8%)	109 (100%)	0,02	130 (59,6%)	88 (40,4%)	0,01

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

A diferença entre as populações, comprovada pelos valores de p^a e p^b , pode ser observada na tabela 5 na distribuição alélica e genotípica; nomeadamente, na população leiomiomas em relação à população controlo: podemos observar que, enquanto os homozigotos dominantes (GG) são predominantes na população controlo (50,6%) , são os heterozigotos (GA) que possuem a maior frequência na população de leiomiomas (52,6%). Na população cancro do colo do útero também podemos observar que existe uma maior percentagem de indivíduos com genótipo AA (24,8%) comparativamente com a da população controlo (9%). Assim, é importante realizar a análise do risco/protecção que cada alelo/polimorfismo confere às patologias.

Tabela 6- Análise do risco por *odds ratio* (OR) dos diferentes genótipos e alelos de COMT para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas.

Leiomiomas			
Genótipo	OR	IC 95%	p-value
GG	0,481	0,293-0,790	0,004*
GA	1,634	1,009-2,648	0,045*
AA	1,707	0,805-3,621	0,160
G	0,600	0,420-0,858	0,005*
A	1,665	1,166-2,378	0,005*
Cancro do colo do útero			
GG	0,767	0,469-1,254	0,290
GA	0,669	0,399-1,121	0,127
AA	3,340	1,658-6,728	<0,0001*
G	0,608	0,423-0,876	0,007*
A	1,644	1,142-2,367	0,007*

*significativo para $p < 0,05$

Podemos observar na **tabela 6** que o alelo A apresenta um maior risco associado em relação às duas populações, e o alelo G apresenta-se assim, como um factor protector. Podemos igualmente observar valores de *odds ratio* para os polimorfismos muito distintos entre as populações. Nos leiomiomas, o genótipo GA apresenta um maior risco associado (OR=1,634; IC (95%) = 1,009-2,648; $p = 0,045$), enquanto o genótipo GG apresenta um efeito protector. Na população cancro do colo do útero, o genótipo AA apresenta um factor de risco associado elevado: OR=3,340; IC (95%) = 1,658 – 6,728; $p < 0,0001$. Os alelos A apresentam-se como factores de risco nas duas populações (OR=1,665; IC (95%) = 1,166-2,378; $p = 0,005$ nos leiomiomas e OR=1,644; IC (95%) = 1,142-2,367; $p = 0,007$).

3 – Relações epistáticas entre os polimorfismos de CYP1A1 e COMT

Uma vez que a COMT e a CYP1A1 estão intimamente ligadas em sequência metabólica, torna-se importante observar se os polimorfismos funcionais das duas enzimas se poderão associar em relação ao risco que concedem para as patologias em estudo. Logo, foi realizada uma análise χ^2 de *Pearson*, para verificar se haveria diferenças significativas entre as associações dos polimorfismos na população controlo comparativamente às associações observadas nas populações patológicas ($\chi^2=29,788$, $p<0,001$ nos leiomiomas e $\chi^2=34,136$, $p<0,001$). Assim, comprovando-se diferenças significativas entre as associações de genótipos da população controlo comparativamente às associações de genótipos das populações patológicas realizou-se uma análise de risco por *odds ratio* para se observar se ocorreriam associações epistáticas de polimorfismos destas enzimas que tornassem os indivíduos mais susceptíveis aos leiomiomas e cancro do colo do útero. Analisaram-se todas as associações de genótipos dos polimorfismos em estudo de COMT e CYP1A1. Serão apresentadas na **tabela 7** apenas as associações que se mostraram estatisticamente significativas.

Tabela 7- Análise do risco por *odds ratio* (OR) para as diferentes associações de genótipos COMT/CYP1A1 para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas.

Leiomiomas			
Genótipo COMT/CYP1A1	OR	IC 95%	p-value
GG/TC	10,309	1,295-82,069	0,007*
GA/TC	6,607	1,882-23,187	0,001*
GA/TT	0,425	0,243-0,743	0,002*
Cancro do colo do útero			
GG/TC	13,699	1,715-109,393	0,002*
GA/TC	5,521	1,502-20,289	0,005*
GA/TT	0,239	0,125-0,455	<0,001*

*significativo para $p<0,05$

Podemos observar que o maior risco se encontra na associação genotípica GG da COMT com o TC do CYP1A1 nas duas populações: OR=10,309; IC (95%) = 1,295-82,069; $p = 0,007$ nos leiomiomas e OR=13,699; IC (95%) = 1,715-109,393; $p = 0,002$ no cancro do colo do útero. A associação GA/TC apresenta igualmente um factor de risco elevado nas duas populações: OR=6,607; IC (95%) = 1,882-23,187; $p = 0,001$ nos leiomiomas e OR=5,521; IC (95%) = 1,502-20,289; $p = 0,005$ no cancro do colo do útero. Por outro lado, a associação GA/TT apresenta, nas duas populações, um efeito protector.

4 - Análise do polimorfismo MPO

Após a amplificação e digestão dos fragmentos, efectuou-se a electroforese e observaram-se os produtos de digestão (**figura 9**). No **anexo C.1, figura suplementar 7** podemos observar a sequência de corte da enzima SsiI.

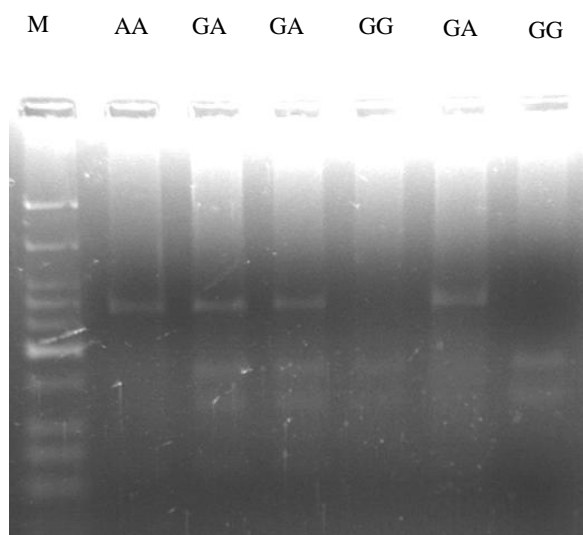


Figura 9 – Gel de digestão do polimorfismo MPO. Podemos observar os 3 polimorfismos com bandas distintas e o marcador de peso molecular, no poço da esquerda, indicado por M (Anexo C.2, figura suplementar 8). O polimorfismo GG é caracterizado por três bandas, 169 bp, 120 bp e 61 bp – esta última banda não é visível. O polimorfismo AA, por outro lado, apresenta duas- uma de 289 bp, e uma de 61 bp – esta última não é visível. O genótipo GA apresenta quanto bandas,

Após a realização do teste estatístico χ^2 de *Pearson* para averiguar se existiam diferenças entre as frequências absolutas genotípicas esperadas em HWE e observadas na população, verificou-se que as populações controlo e leiomiomas não se encontram em HWE ($\chi^2=5,8$ e $p=0,016$; $\chi^2=15,72$ e $p<0,001$, respectivamente); a população de cancro do colo do útero encontra-se em HWE ($\chi^2=1,35$ e $p=0,245$). Na **tabela 8** podemos observar as frequências genotípicas e alélicas de cada amostra populacional. Os valores p^a e p^b (**tabela 8**) são referentes aos resultados obtidos do teste χ^2 de *Pearson*; utilizado para estudar as diferenças entre as populações.

Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica, com respectivos valores de p, em relação ao polimorfismo MPO nas três populações estudadas.

	GG N (%)	GA N (%)	AA N (%)	Total N (%)	p^a	G N (%)	A N (%)	p^b
Controlo	80 (65,6%)	32 (26,2%)	10 (8,2%)	122 (100%)	—	192 (78,7%)	52 (21,3%)	—
Leiomiomas	32 (30,5%)	68 (64,4%)	5 (4,8%)	105 (100%)	<0,001	132 (62,9%)	78 (37,1%)	<0,001
Cancro do colo do útero	51 (51%)	44 (44%)	5 (5%)	100 (100%)	0,019	146 (73%)	54 (27%)	0,198

^a valor da significância do teste χ^2 para os genótipos; nível de significância de 0.05

^b valor da significância do teste χ^2 para os alelos; nível de significância de 0.05

As populações controlo e cancro do colo do útero apresentam o genótipo GG com maior frequência; na população leiomiomas, por outro lado, verifica-se que 64,4% dos indivíduos são heterozigotos (GA), sendo os mais frequentes nesta população. Os valores de p^a são inferiores a 0,05, logo, rejeita-se a hipótese nula, ou seja existem diferenças estatisticamente significativas entre as populações cancro do colo do útero e controlo, e a população leiomiomas e controlo. Os alelos apresentam uma distribuição idêntica nas três populações, com uma maior frequência do alelo G em relação ao A. Podemos observar, na tabela 8, que as populações controlo e cancro do colo do útero têm distribuições alélicas muito semelhantes, enquanto a população leiomiomas apresenta uma maior diferença comparativamente à população controlo. Tal facto é transmitido nos valores de p^b , cujos valores indicam que, neste parâmetro, as populações leiomiomas e controlo apresentam valores distintos e estatisticamente significativos ($p^b < 0,001$), ao contrário da população cancro do colo do útero ($p^b = 0,198$). Assim, uma análise de risco por *odds ratio* é importante, para observar se algum dos polimorfismos pode ser considerado um factor de risco, e se, no caso dos leiomiomas, algum alelo confere protecção ao indivíduo.

Tabela 9 - Análise do risco por *odds ratio* (OR) dos diferentes genótipos e alelos de MPO para o cancro do colo do útero e para os leiomiomas

Leiomiomas			
Genótipo	OR	IC 95%	p-value
GG	0,230	0,132-0,402	<0,001*
GA	5,169	2,928-9,125	<0,001*
AA	0,560	0,185-1,699	0,299
G	0,458	0,303-0,694	<0,001*
A	2,182	1,441-3,304	<0,001*
Cancro do colo do útero			
GG	0,546	0,318-0,939	0,028*
GA	2,210	1,257-3,886	0,005*
AA	0,589	0,195-1,789	0,345

*significativo para $p < 0,05$

Na **tabela 9** podemos observar um valor OR superior na heterozigotia: OR=5,169; IC (95%) = 2,928 – 9,125; $p < 0,001$ nos leiomiomas e OR=2,210; IC (95%) = 1,257 – 3,886; $p = 0,005$ no cancro do colo do útero. O genótipo GG apresenta-se como protector em ambas as patologias. O alelo A apresenta risco associado, enquanto o alelo G é um factor protector nos leiomiomas.

5- Análise da actividade da redutase transmembranar ferricianeto dependente de NADH

Para se analisar a actividade RTM é necessário verificar se os dados das populações em estudo apresentam uma distribuição normal. Observou-se que a população total e a população controlo não apresentam uma distribuição normal para esta variável ($p < 0,001$ para ambas). Em relação às populações patológicas, observamos que ambas têm uma distribuição normal ($p = 0,169$ para os leiomiomas e $p = 0,843$ para o cancro do colo do útero). Na **tabela 10** encontra-se uma análise descritiva das populações em estudo.

Tabela 10 - Actividade da actividade da redutase transmembranar de ferricianeto dependente de NADH nas populações em estudo.

	N	Média $\pm\sigma^*$	Máximo mmol/Lcél/h	Mínimo mmol/Lcél/h	p ^a
Controlo	175	3,60 \pm 0,189	13,233	0,085	——
Leiomiomas	13	5,596 \pm 1,158	15,867	0,219	0,061
Cancro do colo do útero	13	4,064 \pm 0,564	8,512	0,085	0,243

*Resultados apresentados na forma de Média \pm Desvio Padrão

Na população controlo observou-se que uma mediana de 3,067 mmol/Lcél/h, na população leiomioma a mediana é de 4,662 mmol/Lcél/h, e na população cancro do colo do útero esta é 4,130 mmol/Lcél/h. Foi realizado um teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparar as populações: não se observou diferenças significativas (**tabela 10**).

6 - Análise de 17 β -estradiol (E2) circulante

Foi necessário observar se a população total se encontrava em normalidade, assim como as populações isoladas. Observou-se que a população total não apresenta uma distribuição normal ($p < 0,001$), bem como as populações controlo ($p < 0,001$) e cancro do colo do útero ($p = 0,032$). A população leiomioma tem uma distribuição normal ($p = 0,196$). Na **tabela 11** encontra-se uma análise descritiva das populações.

Tabela 11 – Análise descritiva da concentração de E2 circulante nas populações em estudo.

	N	Média $\pm\sigma^*$	Máximo pg/mL	Mínimo pg/mL	p ^a
Controlo	91	32,511 \pm 7,851	412,22	2,43	——
Leiomiomas	41	255,218 \pm 18,085	532,99	55,86	<0,001*
Cancro do colo do útero	20	88,723 \pm 13,670	212,67	19,72	<0,001*

*Resultados apresentados na forma de Média \pm Desvio Padrão

Foi realizado um teste não paramétrico de *Mann-Whitney*, inferindo-se que existem diferenças significativas entre as populações ($p < 0,001$ para ambas as patologias).

V – Discussão

A enzima **CYP1A1** tem como função a hidroxilação dos estrogénios para a sua metabolização, dando origem a CE. Estes aparentam ter efeitos estrogénicos e tumorigénicos, podendo levar a lesões no DNA.

Neste estudo observámos que o alelo C de CYP1A1 apresenta risco associado para as duas patologias; o genótipo TC, apresentou-se, igualmente, como o polimorfismo com um maior risco associado para as duas populações, enquanto a homozigotia TT aparenta ser um factor de protecção, assim como o alelo T (**tabela 4**). Logo, uma maior actividade da enzima está associado a um risco mais elevado, ou seja, está associado a uma maior produção de 2-OH-CE, um catecol estrogénio potencialmente cancerígeno.

A **COMT** é uma enzima extremamente importante na homeostase do organismo; na verdade, esta realiza a destoxificação de vários compostos deletérios. A baixa actividade de COMT foi considerada um factor de risco para algumas doenças benignas e malignas, tal como endometriose, cancro endometrial e cancro da mama (De Oliveira *et al.*, 2008).

Neste estudo verificou-se que apresentar um alelo A é um factor de risco, enquanto o alelo G é um factor protector, tanto na população leiomiomas como cancro do colo do útero. Verificou-se igualmente que os homozigóticos AA apresentam um grande risco associado para o cancro do colo do útero. Nos leiomiomas observámos um maior risco associado à heterozigotia (**tabela 6**).

A enzima COMT expressa pelo alelo A apresenta uma redução da sua actividade, e, com a sua capacidade diminuída, a destoxificação dos estrogénios é mais lenta. Quando a capacidade de metilação da COMT está diminuída, o tempo médio de vida dos catecol-estrogénios é maior, havendo uma maior probabilidade da sua transformação a quinonas reactivas. (De Oliveira *et al.*, 2008).

Uma vez que a **COMT e o CYP1A1** funcionam em sequência metabólica (**figura 2**) podemos estudar as associações de polimorfismos para observar se os resultados obtidos isoladamente para cada enzima se observam quando analisados em conjunto, em interacção epistática. Assim, observámos que a homozigotia da COMT (GG), associada à heterozigotia de CYP1A1 (TC) revelou-se um grande factor de risco nas duas populações, assim como a heterozigotia COMT (GA) associada à heterozigotia do CYP1A1 (TC) (**tabela 7**). Tal resultado é contraditório com o observado em estudos anteriores. A heterozigotia de CYP1A1 associada a actividade mais elevada da COMT ou mesmo a actividade moderada da COMT deveria estar associada à inactivação dos catecol-estrogénios; é interessante observar que este

resultado é igualmente contraditório ao que se observa no estudo da COMT isolada, onde observámos que o alelo A (nas duas populações) estava associado a um maior risco (**tabela 6**).

Este facto poder-se-á dever ao fundo genético da própria população em estudo, que poderá ter um viés associado a este polimorfismo.

A variabilidade nas associações genéticas entre o polimorfismo COMT em estudo sugere que, para além da base genética da actividade desta enzima, factores ambientais também podem estar envolvidos na modulação do risco, através da metilação do promotor da enzima. Vários estudos observaram que a hiper-metilação das ilhas CpG no promotor da COMT estava relacionada com hipo-expressão do gene em alguns tipos de cancro. No estudo de Sasaki *et al.* observou-se que a metilação do promotor da COMT era superior nos tecidos tumorais do que nos tecidos normais. (Sasaki *et al.*, 2003; Abdolmaleky *et al.*, 2009).

A metilação nos resíduos de citosina nas ilhas CpG dos genes é um dos mecanismos de regulação diferencial de expressão génica em resposta ao ambiente. Existem diferentes metil-transferases de DNA que respondem a estímulos ambientais, bem como ao estado fisiológico da célula, metilando sequências específicas no DNA. A modificação do promotor do gene por metilação pode ter efeitos semelhantes aos de alelos menos activos (Abdolmaleky *et al.*, 2009).

O DNA metilado de produzir uma doença fenotípica em resposta a um estímulo ambiental sugere que a observação genética do polimorfismo não é suficiente para inferir a actividade da enzima, uma vez que a alteração epigenética poderá ter os mesmos efeitos na actividade enzimática/expressão da enzima do que polimorfismos funcionais.

Para além disto, não podemos esquecer que a COMT e a CYP1A1 actuam numa via com muitas outras enzimas. O CYP1A1 funciona como hidroxilase de estrogénios juntamente com CYP1B1, que origina 4-OH-CE, que é igualmente metilado pela COMT. Em contraste com o 4-OH-CE, 2-OH-CE, formado por CYP1A1, não é carcinogénico directamente, mas pode, no entanto, sofrer redox metabólico, gerando radicais livres e intermediários reactivos. Uma vez que 2-OH-CE é metabolizada por COMT mais rapidamente do que 4-OH-CE, radicais livres não são gerados com tanta facilidade (Tsuchiya, 2005; Gooden *et al.*, 2007).

Assim, a COMT actua mais rapidamente sobre o 2-OH-CE do que sobre o 4-OH-CE produzido por CYP1B1. A actividade de COMT sobre 2-OH-CE produz o anti-tumorigénico 2-Me-O-E2, no entanto o 4-OH-CE está mais “livre” para ser oxidado a quinonas e semi-quinonas, para além de actuar, por si, como estrogénio.

Para além disto, poderá ocorrer uma inibição da enzima CYP1A1, uma vez que os produtos metilados da COMT apresentam um efeito de retroacção negativa sobre CYP1A1; assim, ocorre um desvio para a via de 16- α -hidroxilação para ocorrer a destoxificação dos estrogénios do organismo. Esta via, catalisada por CYP3A4, apresenta efeitos proliferativos nas células, podendo contribuir igualmente para um aumento de risco para as patologias em estudo (Dawling *et al.*, 2003).

A associação da heterozigotia da COMT com o genótipo TT da CYP1A1 apresenta um factor protector nas duas populações; TT é o genótipo com menos actividade de CYP1A1 – ou seja, não ocorre produção de 2-OH-CE – e, está associado a actividade moderada da COMT, ou seja, podemos supor que está a ocorrer uma O-metilação apropriada do produto de CYP1A1.

No caso da **MPO**, o alelo selvagem G faz com que o factor de transcrição SP1 se ligue mais facilmente, aumentando a expressão da MPO. No presente estudo podemos observar que o genótipo GG apresenta um factor protector em ambas as patologias. O genótipo heterozigoto por outro lado está associado a um maior risco de cancro do colo do útero e leiomioma. Esta tendência também é observada quando se analisam as frequências alélicas (**tabela 9**).

A maior actividade do alelo G foi ligada a várias doenças, enquanto a baixa actividade associada ao alelo A foi associada a menor quantidade de PAHs e menor produção de ROS – diminuindo o risco de doenças; nomeadamente a doença coronária, doença de Alzheimer, a esclerose múltipla, a leucemia mielóide, e cancros do pulmão e do esófago (He *et al.*, 2009; Pabalan *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2013).

No entanto, observaram-se inconsistências nos estudos anteriores: ocorrem diferentes resultados em diferentes populações; tal facto pode dever-se a diferenças genéticas e ambientais nas populações em estudo. Uma meta-análise de vários estudos de cancro da mama demonstrou que o genótipo AA conferia maior protecção às mulheres portadoras. No entanto, observou-se que o genótipo GG aumenta a taxa de sobrevivência em mulheres com cancro de mama de primeiro estágio, a receber quimioterapia. Este facto sugere que, enquanto a MPO promove cancro de mama, poderá agir sinergicamente com a quimioterapia (Chu *et al.*, 2010; Castillo-Tong *et al.*, 2013; Tefik *et al.*, 2013).

O cancro do colo do útero tem como factor etiológico o HPV, um vírus que infecta as zonas de transformação dos tecidos; o sistema oxidante, do qual a MPO faz parte, poderá ser importante no controlo destes agentes (Mustea *et al.*, 2007).

Uma vez que a MPO é importante no controlo microbica, podemos supor que esta poderá ser importante como protectora nas neoplasias iniciadas por agentes infecciosos oncológicos.

No estudo de Mustea *et al.* foi observada baixa actividade de MPO em mulheres com cancro do colo do útero, indicando que indivíduos com baixa actividade desta enzima poderão ser mais susceptíveis a desenvolvimento de cancro do colo do útero (Mustea *et al.*, 2007).

A MPO produz ROS, e, estes são necessário em pequenas quantidades, uma vez que estão envolvidos em vários mecanismos importantes para a célula. No entanto, o desequilíbrio oxidante/antioxidante pode levar a processos oncogénicos nas células. Enquanto as células cancerígenas necessitam de uma maior quantidade de ROS para a sua alta taxa de proliferação, uma quantidade de ROS excessiva também poderá levar a própria célula transformada à apoptose (Fruehauf & Meyskens, 2007; Sosa *et al.*, 2013).

Assim, poderemos sugerir que grandes quantidades de ROS podem ser benéficas em ambas as patologias, uma vez que poderá provocar a apoptose das células transformadas – podendo explicar o grande factor de risco associado a heterozigotia de MPO, mas não ao genótipo mais activo desta enzima (GG).

Também poderemos supor que, uma vez que o sistema imunitário tem um papel importante na defesa do corpo contra cancro, e pode assistir na eliminação de células cancerígenas, uma grande quantidade de MPO também pode proteger o indivíduo de neoplasias (Mustea *et al.*, 2007).

No caso do cancro do colo do útero, a MPO poderá, igualmente, ser importante na depuração do vírus do organismo, evitando uma infecção persistente, possivelmente oncogénica.

No presente estudo, o facto das populações controlo e cancro do colo do útero, no polimorfismo da MPO, não se encontram em HWE pode indicar que não existe uma distribuição aleatória dos genótipos, e que estas amostras populacionais podem não ser representativas da população, não sendo possível inferir com certeza acerca dos dados.

A análise da **RTM** mostrou que os dados entre as populações não diferiam de modo significativo, mostrando que a actividade desta enzima antioxidante não se altera nas patologias estudadas.

Em relação à **concentração de E2 circulante** podemos observar que ambas as populações patológicas apresentam níveis superiores desta hormona no sangue (**tabela 12**). O estradiol apresenta concentrações muito variáveis, dependendo da altura do ciclo sexual da

mulher (**anexo A.1, figura suplementar 1**); também se alteram com a menopausa (ocorrendo uma descida drástica dos valores de estradiol circulante nesta fase da vida da mulher) (Lim *et al.*, 2010). No entanto, podemos observar pelos valores que existem diferenças entre as populações, ocorrendo uma diferença estatisticamente significativa entre estas. Em ambas as populações patológicas observou-se uma maior concentração de estradiol.

Tendo em conta o referido anteriormente, nomeadamente o efeito tumorigénico desta hormona, quer pela sua acção directa na proliferação de células quer pelo seu metabolismo, estes resultados seriam de esperar e comprovam os efeitos que esta hormona poderá exercer no processo de oncogénese.

Podemos observar que os leiomiomas apresentam uma concentração muito superior desta hormona comparativamente às outras populações – esta neoplasia poderá mais dependente dos esteróides sexuais do que o cancro do colo do útero. Assim, o processo de neoplasia associado aos leiomiomas está intimamente relacionado com a concentração de estradiol, observando-se concentrações muito elevadas desta hormona nos indivíduos em estudo que apresentavam leiomiomas.

Para a realização deste estudo foi necessário utilizar três populações: duas populações patológicas distintas, constituídas por mulheres que apresentam leiomiomas ou cancro do colo do útero e uma população controlo, constituída por mulheres que não apresentavam qualquer uma das patologias. Devido a dependência hormonal dos leiomiomas, há uma maior tendência para a ocorrência destes durante a vida reprodutiva da mulher; havendo evidências que demonstram que estes páram de crescer durante a menopausa; nalguns casos há até regressão do tumor (Houston *et al.*, 2001). O cancro do colo do útero também é encontrado em mulheres com menos idade devido às práticas sexuais dos mais jovens.

VI – Conclusões e considerações finais

Existem vários estudos publicados que comprovam a vertente tumorigénica do estrogénio; como tal, este trabalho, tinha como objectivo estudar polimorfismos funcionais na via do metabolismo do estrogénio em duas patologias muito distintas: os leiomiomas, tumores benignos; e cancro do colo do útero, uma neoplasia maligna.

Assim, neste estudo observámos que o alelo responsável pela maior actividade de CYP1A1 é um factor de risco em ambas as patologias. Também na COMT podemos concluir que o alelo que concede menos actividade à enzima apresenta-se como um factor de risco para leiomiomas e cancro do colo do útero. A relação entre os polimorfismos destas duas enzimas foi um caso interessante que necessita de mais estudo; o facto de o genótipo GG da COMT revelar-se protector quando estudado individualmente, mas apresentar-se com um factor de risco na associação com o heterozigoto de CYP1A1 revelou-se uma surpresa. Como tal será necessário aprofundar mais este resultado para se poder obter respostas. Um estudo com mais amostras, envolvendo mais enzimas da via, como o CYP1B1 seria importante, bem como estudar as actividades das enzimas. Estudar o nível de metilação das enzimas poderia ser, igualmente, esclarecedor. Os resultados obtidos da MPO foram significativos; esta é uma enzima importante no sistema imunitário; no entanto, pode tornar-se igualmente perigosa devido aos oxidantes que produz. Assim, observámos que o genótipo GA se revelou um factor de risco em ambas as patologias – isto pode indicar que a MPO é importante na eliminação do HPV do organismo; ou poderá ser um indício de que a produção excessiva de ROS provoca apoptose nas células transformadas. No entanto, deveria ser realizada uma correlação entre o genótipo da MPO e a sua actividade e utilizar um maior número de amostras.

A concentração de estradiol circulante foi superior nas populações patológicas corroborando a teoria que esta hormona é tumorigénica, quer directa quer indirectamente; a concentração superior nos leiomiomas sugere que este tumor é mais dependente de esteróides comparativamente ao cancro do colo do útero. Observa-se uma diferença de valores de mediana de idade entre as populações. Esta diferença é aceitável como medida de comparação no estudo das variáveis apresentadas, uma vez que se tratam de polimorfismos, que não se alteram com a idade. No entanto, deveria ser realizado um estudo futuro com populações estratificadas por idade, especificamente no caso da concentração de estradiol circulante. Os resultados obtidos são idênticos nos leiomiomas e cancro do colo do útero; estes são dois tumores muito diferentes, no entanto, não houve grandes distinções de resultados entre estes, indicando aparência em termos de susceptibilidade.

VII - Bibliografia

- Abdolmaleky, H. M., Cheng, K., Faraone, S. V., Wilcox, M., Glatt, S. J., Gao, F., Smith, C. L., Aebi, B., Carnevale, J., Pan, H., Papageorgis, P., Jose, F., Sivaraman, V., Tsuang, M. T., Thiagalingam, S. (2009). Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet.*, 15(21), 3132–3145. doi:10.1093/hmg/ddl253.
- Arseniy E., Yuzhalin & Anton G. Kutikhin (2012): Common Genetic Variants in the Myeloperoxidase and Paraoxonase Genes and the Related Cancer Risk: A Review, *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 30:4, 287-322
- Au, W. (2003). Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2-3), 361–364. doi:10.1016/j.mrrev.2003.05.001
- Au, W., Abdou-Salama, S., Sierra-Torres, C. H., & Al-Hendy, A. (2007). Environmental risk factors for prevention and molecular intervention of cervical cancer. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(6), 671–8. doi:10.1016/j.ijheh.2006.10.003
- Barão, M. A., Oliveira, E., Gomes, M. T. V., Da Silva, I. D. C. G., Sartori, M. G. F., Girão, M. J. B. C., & Castro, R. D. A. (2010). The role of MSP I CYP1A1 gene polymorphism in the development of uterine fibroids. *Fertility and sterility*, 94(7), 2783–5. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.05.034
- Blake, R. E. (2007). Leiomyomata Uteri : Hormonal and Molecular Determinants of Growth. *J Natl Med Assoc*, 99(10): 1170–1184.
- Bolton, J. L. & Thatcher, G. R. J. (2008). Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), 93–101
- Castillo-Tong, D. C., Pils, D., Heinze, G., Braicu, I., Sehouli, J., Reinthaller, A., Schuster, E., Wolf, A., Watrowski, R., Maki, R., Zeillinger, R., Reynolds, W.F. (2013). Association of myeloperoxidase with ovarian cancer. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. doi:10.1007/s13277-013-1017-3
- Cavalieri, E. L., Stack, D. E., Devanesan, P. D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S. L., Patil, K. D., Gross, M. L., Gooden, J. K., Ramanathan, R., Cerny, R. L., Rogan, E.G. (1997). Molecular origin of cancer : Catechol estrogen-3, 4-quinones as endogenous tumor initiators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(September), 10937–10942.
- Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., & Chakravarti, D. (2002). Initiation of cancer and other diseases by catechol ortho-quinones : a unifying mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 665–681.
- Cavalieri, E. L., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., & Roy, D. (2000). Chapter 4 : Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents — DNA Adducts and Mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 6805, 75–93.
- Chu, H., Wang, M., Wang, M., Gu, D., Wu, D., Zhang, Z., Tang, J., Zhang, Z. (2010). The MPO-463G >A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 43 case-control studies. *Mutagenesis*, 25(4), 389–95. doi:10.1093/mutage/geq018

- Chung, S., Franceschi, S., & Lambert, P. F. (2011). Estrogen and ER α : Culprits in Cervical Cancer?, *Trends Endocrinol Metab.* 2010 August; 21(8): 504–511.
- Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 370, 890–907. doi:10.1016/S0140-6736(13)60022-7
- Crow, J. M. (2012). HPV: The global burden. *Nature*, 488(7413), S2–3. doi:10.1038/488S2a
- Dawling, S., Roodi, N., Parl, F. F., Dawling, S., Roodi, N., & Parl, F. F. (2003). Methoxyestrogens Exert Feedback Inhibition on Cytochrome P450 1A1 and 1B1 Methoxyestrogens Exert Feedback Inhibition on Cytochrome P450 1A1 and 1B1. *Cancer research*, 3127–3132.
- De Marco, F. (2013). Oxidative stress and HPV carcinogenesis. *Viruses*, 5(2), 708–31. doi:10.3390/v5020708
- De Oliveira, E., De Aquino Castro, R., Gomes, M. T. V., Da Silva, I. D. C. G., Baracat, E. C., De Lima, G. R., Sartori, M. G. F., Girão, M. J. B. C. (2008). The catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and prevalence of uterine fibroids. *Maturitas*, 60(3-4), 235–8. doi:10.1016/j.maturitas.2008.07.001
- Franco, E. L., Duarte-Franco, E., & Ferenczy, a. (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal/ Journal de l'Association medicale canadienne*, 164(7), 1017–25.
- Fruehauf, J. P., & Meyskens, F. L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), 789–94. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2082
- Garte, S. (1998). The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, 19(8), 1329–32.
- Gooden, K. M., Schroeder, J. C., North, K. E., Gammon, M. D., Hartmann, K. E., Taylor, J., & Baird, D. D. (2007). Val153Met polymorphism of catechol-O-methyltransferase and prevalence of uterine leiomyomata. *Reproductive sciences (Thousand xxOaks, Calif.)*, 14(2), 117–20. doi:10.1177/1933719106298687
- Gruber, C. J., Tschuggel, W., Scheneberger, C., & Huber, J. C. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 346(5), 340–352.
- He, C., Tamimi, R. M., Hankinson, S. E., Hunter, D. J., & Han, J. (2009). A prospective study of genetic polymorphism in MPO, antioxidant status, and breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment*, 113(3), 585–94. doi:10.1007/s10549-008-9962-z
- Herr, D., Bettendorf, H., Denschlag, D., Keck, C., & Pietrowski, D. (2006). Cytochrome P2A13 and P1A1 gene polymorphisms are associated with the occurrence of uterine leiomyoma. *Archives of gynecology and obstetrics*, 274(6), 367–71. doi:10.1007/s00404-006-0201-8
- Hirata, H., Hinoda, Y., Okayama, N., Suehiro, Y., Kawamoto, K., Kikuno, N., Rabban, J. T., Chen, L., Dahiya, R. (2008). COMT polymorphisms affecting protein expression are risk factors for endometrial cancer. *Molecular carcinogenesis*, 47(10), 768–74. doi:10.1002/mc.20432
- Houston, K. D., Hunter, D. S., Hodges, L. C., & Walker, C. L. (2001). Uterine Leiomyomas: Mechanisms of Tumorigenesis. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 100–104.

doi:10.1080/019262301301418900

- Huang, C. S., Chern, H. D., Chang, K. J., Cheng, C. W., Hsu, S. M., & Shen, C. Y. (1999). Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer research*, 59(19), 4870–5.
- Khvostova, E. P., Pustyl'nyak, V. O., & Gulyaeva, L. F. (2012). Genetic polymorphism of estrogen metabolizing enzymes in Siberian women with breast cancer. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16(3), 167–73. doi:10.1089/gtmb.2011.0131
- Kim, C. J., Um, S. J., Kim, T. Y., Kim, E. J., Park, T. C., Kim, S. J., Namkoong, S. E., Park, J. S. (2000). Regulation of cell growth and HPV genes by exogenous estrogen in cervical cancer cells. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 10(2), 157–164.
- Kiyohara, C., Yoshimasu, K., Takayama, K., & Nakanishi, Y. (2005). NQO1 , MPO , and the risk of lung cancer : A HuGE review. *Genet Med.* 7(7), 13–15. doi:10.1097/01.GIM.0000177530.55043.c1
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, 19(19), 5444.
- Lau, D., & Baldus, S. (2006). Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & therapeutics*, 111(1), 16–26. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.023
- Li, Y., Qin, Y., Wang, M.-L., Zhu, H.-F., & Huang, X.-E. (2011). The myeloperoxidase-463 G>A polymorphism influences risk of colorectal cancer in southern China: a case-control study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 12(7), 1789–93.
- Lim, H. J., & Wang, H. (2010). Uterine disorders and pregnancy complications : insights from mouse models. *J Clin Invest*, 120(4), 1004–1015. doi:10.1172/JCI41210.1004
- Marques, F., & Bicho, M. P. (1997). Activation of a NADH Dehydrogenas in the human erythrocyte by Beta-Adrenergic agonists: possible involvement of a G protein in enzyme activation. *Biol Signals*, (6), 52–61.
- Martínez-Ramírez, O. C., Pérez-Morales, R., Castro, C., Flores-Díaz, a, Soto-Cruz, K. E., Astorga-Ramos, a, Gonsebatt, M. E., Casas, L., Valdés-Flores, M., Rubio, J. (2013). Polymorphisms of catechol estrogens metabolism pathway genes and breast cancer risk in Mexican women. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22(3), 335–43. doi:10.1016/j.breast.2012.08.004
- May, J. M., Qu, Z., & Whitesell, R. R. (1995). Ascorbate is the major electron donor for a transmembrane oxidoreductase of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1238, 127–136.
- Moodley, M., Moodley, J., Chetty, R., & Herrington, C. S. (2003). The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 13(2), 103–10.
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer*, 10(8), 550–60. doi:10.1038/nrc2886

- Muñoz, N., Castellsagué, X., De González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/1–10. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.115
- Mustea, A., Heinze, G., Sehouli, J., Koensgen, D., Wolf, A., Gutu, L., Sofroni, D., Pirvulescu, C., Braicu, E. I., Schuster, E., Zeillinger, R., Tong, D. (2007). The -463G/A polymorphism in myeloperoxidase gene and cervical cancer. *Anticancer research*, 27(3B), 1531–5.
- Pabalan, N., Jarjanazi, H., Sung, L., Li, H., & Ozelik, H. (2012). Menopausal status modifies breast cancer risk associated with the myeloperoxidase (MPO) G463A polymorphism in Caucasian women: a meta-analysis. *PloS one*, 7(3), e32389. doi:10.1371/journal.pone.0032389
- Paraskevaidis, A., Drakoulis, N., Roots, L., Orfanos, C. E., & Zouboulis, C. C. (1998). Polymorphisms in the Human Cytochrome P-450 1A1 Gene (CYP1A1) as a Factor for Developing Acne. *Dermatology*, (196), 171–175.
- Pereira, A., Neves, J., Bicho, M. C., Carvalho, R., Lopes, C., Clara, J. P. G., & Bicho, M. P. (2006). Actividade de Duas Enzimas Associadas à Apoptose e Envelhecimento Celular na Hipertensão Arterial. *Rev Port Cardiol* (16), 189–195.
- Qin X., Deng Y., Zeng Z.Y., Peng Q.L., Huang X.L., Mo, C.J., Li, S., Zhao, J.M. (2013) Myeloperoxidase Polymorphism, Menopausal Status, and Breast Cancer Risk: An Update Meta-Analysis. *PLoS ONE* 8(8): e72583. doi:10.1371/journal.pone.0072583
- Roy, D., Cai, Q., Felty, Q., & Narayan, S. (2007). Estrogen-induced generation of reactive oxygen and nitrogen species, gene damage, and estrogen-dependent cancers. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 10(4), 235–57. doi:10.1080/15287390600974924
- Rudolph, V., Rudolph, T. K., Kubala, L., Clauberg, N., Maas, R., Pekarova, M., Klinke, A., Lau, D., Szöcs, K., Meinertz, T., Böger, R. H., Baldus, S. (2009). A myeloperoxidase promoter polymorphism is independently associated with mortality in patients with impaired left ventricular function. *Free radical biology & medicine*, 47(11), 1584–90. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.001
- Rylander-rudqvist, T., Wedrén, S., Jonasdottir, G., Wedre, S., & Ahlberg, S. (2004). Cytochrome P450 1B1 Gene Polymorphisms and Postmenopausal Endometrial Cancer Risk . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1515–1520.
- Sasaki, M., Kaneuchi, M., Fujimoto, S., Tanaka, Y., & Dahiya, R. (2003). CYP1B1 gene in endometrial cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1-2), 171–176. doi:10.1016/S0303-7207(03)00079-0
- Sasaki, M., Kaneuchi, M., Sakuragi, N., Sasaki, M., Kaneuchi, M., Sakuragi, N., & Dahiya, R. (2003). Multiple Promoters of Catechol-O-methyltransferase Gene Are Selectively Inactivated by CpG Hypermethylation in Endometrial Cancer Multiple Promoters of Catechol-O-methyltransferase Gene Are Selectively Inactivated by CpG Hypermethylation in Endometrial Ca. *Cancer research*, (63), 3101–3106.
- Schiffman, M., & Kjaer, S. K. (2003). Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 20852(31), 14–9.
- Schipfer, W., Neophytou, B., Trobisch, R., Groiss, O., & Goldenberg, H. (1985). Reduction of extra-cellular potassium ferricyanide by transmembrane NADH: (acceptor) oxidoreductase of human erythrocytes. *The International journal of biochemistry*, 17(7), 819–23.

- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., & LLeonart, M. E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing research reviews*, 12(1), 376–90. doi:10.1016/j.arr.2012.10.004
- Tanaka, Y., Sasaki, M., Shiina, H., Tokizane, T., Deguchi, M., Hirata, H., Hinoda, Y., Okayama, N., Suehiro, Y., Urakami, S., Kawakami, T., Kaneuchi, M., Pookot, D., Igawa, M., Okuyama, A., Ishii, N., Dahiya, R. (2006). Catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and sporadic prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(2), 238–44. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0550
- Tefik, T., Kucukgergin, C., Sanli, O., Oktar, T., Seckin, S., & Ozsoy, C. (2013). Manganese superoxide dismutase Ile58Thr, catalase C-262T and myeloperoxidase G-463A gene polymorphisms in patients with prostate cancer: relation to advanced and metastatic disease. *BJU international*, 112(4), E406–14. doi:10.1111/bju.12176
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer letters*, 227(2), 115–24. doi:10.1016/j.canlet.2004.10.007
- Vadlamuri, S. V, Glover, D. D., Turner, T., & Sarkar, M. A. (1998). Regiospecific expression of cytochrome P4501A1 and 1B1 in human uterine tissue. *Cancer letters*, 122(1-2), 143–50.
- Walker, C. L. (2002). Role of Hormonal and Reproductive Factors in the Etiology and Treatment of Uterine Leiomyoma. *Recent Prog Horm Res.* 57, 277-94.
- Wang, C. (1980). Human erythrocyte NADH: (acceptor) oxidoreductase kinetic properties and competitive substrate inhibition by ferricyanide. *Biochim Biophys Acta.* 616, 22–29.
- Yager, J. D. (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27(27), 67–73.

VIII –Anexos

Anexo A – Complementos para a Introdução Teórica

A.1 – O ciclo menstrual nas mulheres

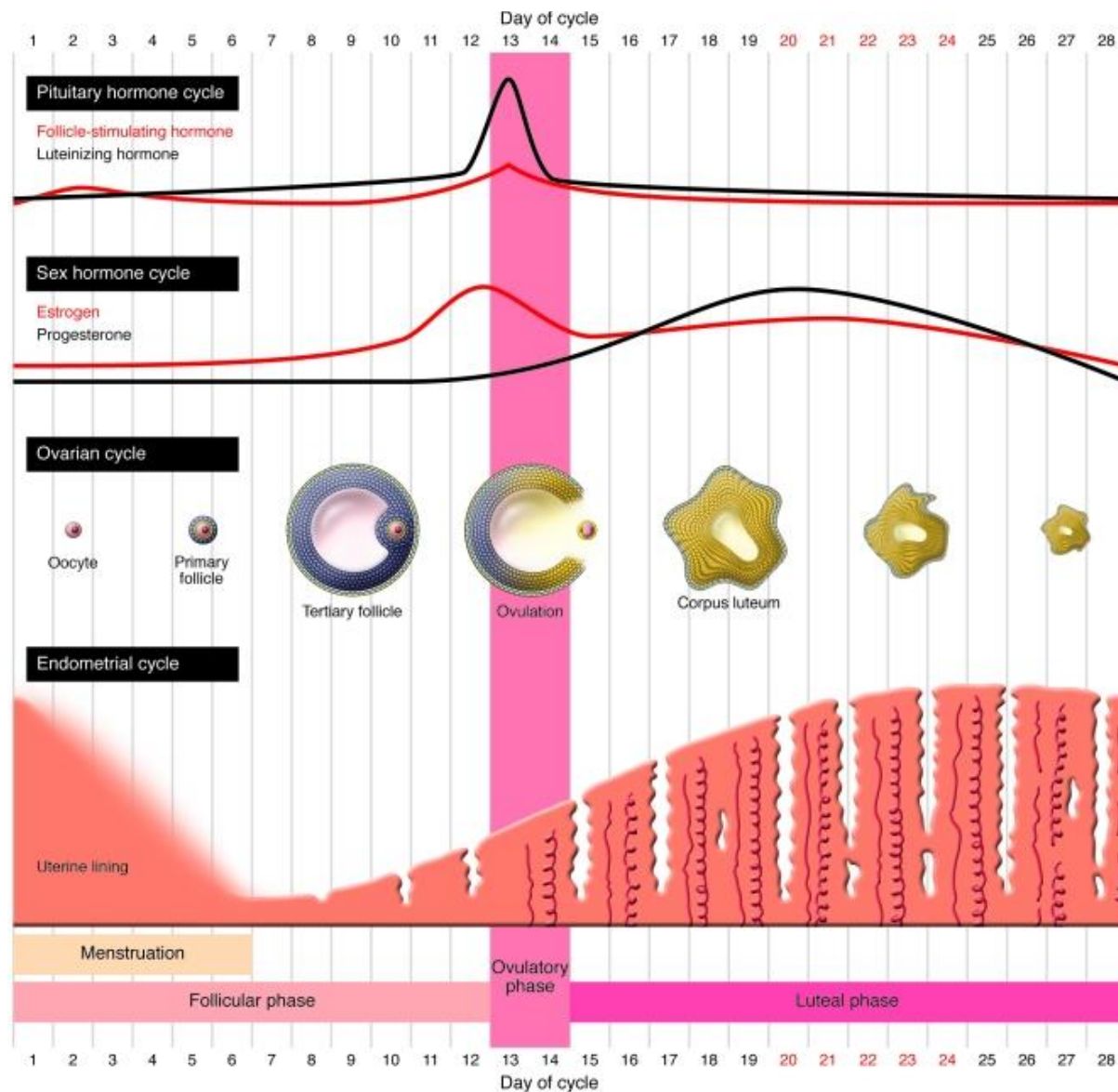


Figura Suplementar 1- Ciclo menstrual na mulher. O útero sofre uma sequência de transformações celulares cada 28 dias. Antes da ovulação, o útero encontra-se na fase folicular, e apresenta um endométrio mais fino. A ovulação ocorre no meio do ciclo, acompanhada por uma maior quantidade de hormona estimuladora de folículos (FSH - follicle-stimulating hormone) e estrogénio. Nesta fase, as células do endométrio são estimuladas, e começa a ocorrer o espessamento do endométrio através da proliferação das células epiteliais (retirado de Lim & Wang *et al.*, 2010)

A.2 – Ciclo Viral do HPV

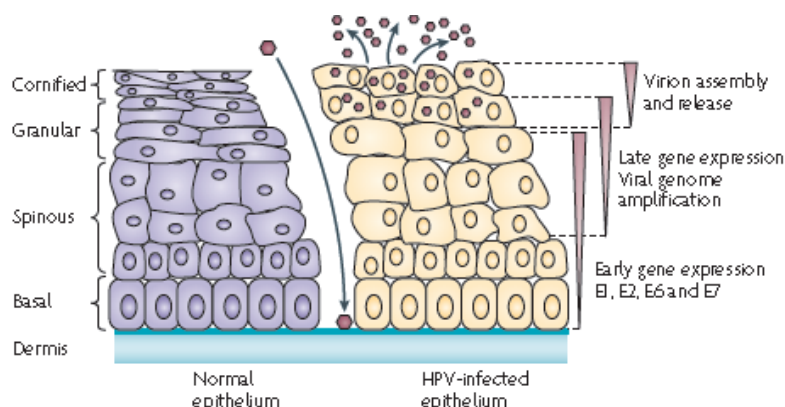


Figura Suplementar 2– Ciclo Viral do HPV. Os HPV's infectam queratinócitos da camada basal do epitélio através de micro-fendas. Durante a infecção (epitélio da direita) o genoma viral encontra-se no núcleo como epissomas de baixa expressão, e os genes virais precoces são expressos. O genoma viral é replicado em sincronia com o genoma do hospedeiro. A célula afasta-se da camada basal, e entra em diferenciação. Este fenómeno induz a fase produtiva do ciclo viral, e ocorre a produção das proteínas tardias. Após a formação de novos viriões, estes podem re-infectar (Moody *et al.*, 2010)

A.3 – Processos oncogénicos do HPV

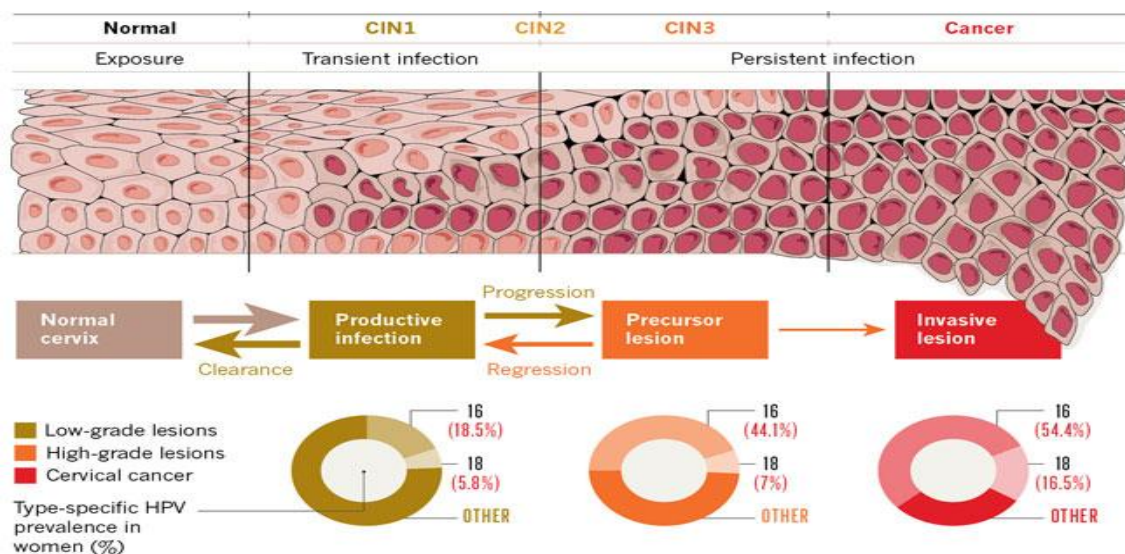


Figura Suplementar 3 – Processos oncogénicos do HPV. A infecção por HPV pode levar ao aparecimento de células anormais no tamanho e forma classificadas como neoplasia cervical intra-epitelial 1 (CIN 1 – *cervical intraepithelial neoplasia* 1) – esta lesão normalmente desaparece após alguns meses sem tratamento. Um grande número de células pré-cancerosas na superfície do cérvix, muito distintas de células normais são classificadas como lesões CIN 3. Estas ainda podem desaparecer, quer espontaneamente, quer através de tratamento. O tipo 16 e 18 de HPV provocam apenas uma pequena percentagem de infecção inicial, mas, juntos, são responsáveis pela maioria dos cancros cervicais (adaptado de Crow, 2012)

Anexo B - Protocolos

B.1 – Protocolo de extracção de DNA por método de *salting-out*

1. O sangue periférico é colhido num tubo com anticoagulante EDTA.
2. Transfere-se 2mL para um tubo graduado de 10mL.
3. Adiciona-se 1 volume de TKM X-100 , por cada volume de sangue.
4. Adiciona-se 25mL de IPGEPAL CA 630 por cada mL de sangue; este componente lisa as células, libertando os componentes intra-celulares.
5. O tubo é agitado 4-5 vezes por inversão vigorosa.
6. Segue-se uma centrifugação a 2200rpm, à temperatura de aproximadamente 4°C, durante 15min, que deve ser repetida caso o *pellet* formado não adira ao fundo do tubo.
7. O sobrenadante é rejeitado. Conserva-se o *pellet* que contém, entre outros constituintes, DNA. Adiciona-se 1mL de tampão TKM 1 por cada mL de sangue.
8. Centrifuga-se à mesma temperatura, a 1600rpm e por um período de 10min, descartando-se o sobrenadante.
9. O passo anterior é repetido no máximo 2 vezes, de forma a obter um *pellet* branco, evitando assim perdas excessivas de DNA.
10. Ressuspende-se o *pellet* (vórtex) na solução TKM 2 numa proporção de 160µL de tampão por mL de sangue.
11. Adiciona-se 10µL de SDS 10% por mL de sangue e a mistura é ressuspensa com o auxílio de uma micropipeta. Este reagente dissolve as proteínas ainda existentes em solução.
12. Incuba-se a 55°C durante 10min.
13. Ao fim deste intervalo de tempo o conteúdo do tubo é transferido para um *eppendorf* ao qual se adicionam 60µL de NaCl saturado por mL de sangue. Visualiza-se de imediato a precipitação de proteínas existentes na suspensão de DNA que formam uma fase branca opaca distinta de outra completamente transparente (suspensão de DNA); este tubo é agitado através do vórtex.
14. Centrifuga-se (centrífuga de tubos de reacção) a 1200rpm, à temperatura ambiente e por 30min (*salting-out*).
16. Verte-se o sobrenadante, que contém o DNA, resultante da centrifugação anterior para um tubo de vidro e adicionam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado (colocado a -20°C, cerca de 5min antes de ser utilizado).
17. O tubo, devidamente selado, é invertido suavemente até precipitação do DNA.
18. Ressuspende-se o DNA em 200µL de tampão TE previamente colocados no tubo de reacção devidamente rotulado e armazena-se a 4°C.

B.2 - Protocolo “Actividade de Redutase Transmembrantar”

1. Em quatro tubos, denominados B0, T0, B20, T20, adicionou-se 700 µL de tampão fosfato salino 0.1 M pH 7.4 com glucose (10mM) e 33 µL de glóbulos vermelhos lavados.
2. Os 4 tubos são incubados a 37°C durante 5 min com agitação.
3. Após este tempo adiciona-se 12,5 µL de ferricianeto 0.1 M em NaCl 0.9% (v/v) aos tubos T0 e T20.
4. Os tubos B0 e T0, centrifugam-se a 2000rpm, durante 10min, a 4°C.
5. Os tubos B20 e T20 continuam a incubação até perfazer 20min. Após este tempo, centrifugam-se estes tubos durante 10 min a 2000 rpm e a 4°C.
6. Retiram-se 350 µL dos sobrenadantes da centrifugação dos 4 tubos e colocaram-se em tubos com a devida identificação.
7. Adiciona-se 6,5 µL de ferricianeto 0.1 M em NaCl 0.9% (v/v) aos B0 e B20.
8. Incuba-se o tubo B20 a 37°C durante 20 min com agitação enquanto os restantes foram colocados a 4°C.

B.2.1 -Leitura de absorvência (535 nm)

Mistura reaccional (na proporção 2:2:1:1):

- Acetato de sódio 3M pH 6 (acertado com ácido acético 0.1M),
- Ácido cítrico 0.2M,
- Cloreto Férrico 0.0033M (em ácido acético 0.1M)
- Batofenantrolina 6.74×10^{-3} M

Para as leituras utilizou-se um branco de referência (700µL de H₂O e 300 µL da mistura reaccional). Nos restantes tubos colocou-se 600 µL de H₂O, 100 µL do sobrenadante respectivo (B0, B20, T0 e T20) e 300 µL mistura reaccional. Agitou-se no vórtex e colocou-se no escuro durante 5min. Por fim leram-se as absorvências a 535nm.

B.2.2 – Determinação do hematócrito

A determinação do hematócrito fez-se passando os glóbulos vermelhos lavados por um tubo capilar. Centrifugou-se os capilares a 15250 g durante 7 min. Uma vez centrifugados determinou-se o volume de células relativamente ao volume total da suspensão, comparando a altura da coluna de células com a altura da coluna de líquido.

B.2.3 - Curva de calibração

Esta técnica tem por base a reacção enzimática onde o ferricianeto é convertido em ferrocianeto pela redutase transmembranar, sendo este último o produto da reacção que vai ser medido aquando da leitura das absorvências.

Desta forma a curva de calibração foi efectuada a partir da leitura das absorvências de diluições de ferrocianeto, com diferentes concentrações.

H ₂ O (μL)	700	680	640	580	500	300	100
Ferrocianeto 0,0473mM (μL)	—	20	60	120	200	400	600

Tabela Suplementar 1 – Valores para realização da curva de calibração.

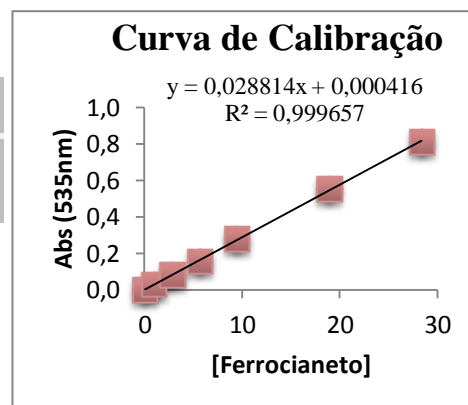


Figura Suplementar 4– Curva de calibração para o cálculo da actividade da RTM.

B.2.4 – Cálculo da Actividade da Redutase Transmembranar

A actividade da Redutase Transmembranar (mmol/Lcél/h) é calculada de acordo com a equação:

$$Act = \frac{1-Htf}{Htf} \times \frac{3 \times \Delta f}{\epsilon} \times 10$$

onde Htf corresponde ao hematócrito final, obtido através da fórmula $Htf = \frac{Ht \times 0,3}{6}$ e Δf corresponde a $[(AbsT20 - AbsT0) - (AbsB20 - AbsB0)]$, e ϵ trata-se do declive da curva de calibração que corresponde ao coeficiente de correlação do ferrocianeto.

B.3 – Kit ELISA “Estradiol Assay” de R&D Systems (Número de catálogo KGE014)

A técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) baseia-se na ligação anticorpo-antígeno associada a fluorescência. Neste kit em particular o anticorpo monoclonal específico para o estradiol liga-se ao anticorpo anti-rato que se encontra na micro-placa. Após uma lavagem para se retirar o excesso de anticorpo monoclonal, o estradiol presente na amostra compete com uma quantidade pré-definida de estradiol associada a HRP (*horseradish peroxidase*). A HRP é uma enzima capaz de catalisar uma reacção que produz fluorescência. Assim, é adicionada uma solução de substrato de HRP aos poços para determinar a quantidade de enzima ligada ao anticorpo. Através de uma solução STOP a reacção da HRP pára, e a absorvência é lida a 450 nm. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de estradiol na amostra.

B.3.1 – Curva de Calibração

Procedeu-se à realização de uma curva de calibração para se poder inferir a concentração de estradiol nas amostras. Utilizou-se a equação da recta para calcular a concentração de estradiol.

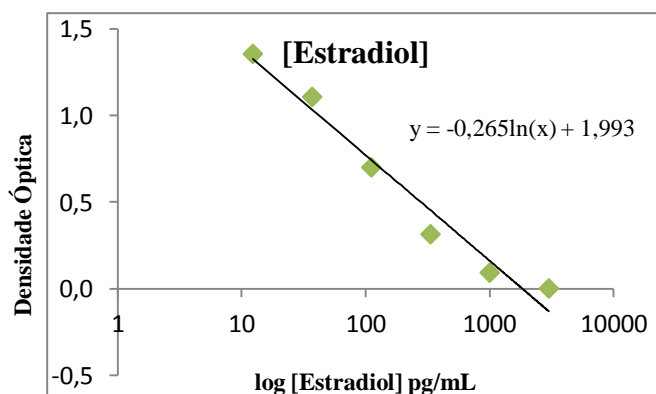


Figura Suplementar 5– Curva de calibração para o cálculo da concentração de estradiol.

Anexo C – Complementos para Resultados

C.1 – Sequência de corte das enzimas utilizadas para a genotipagem

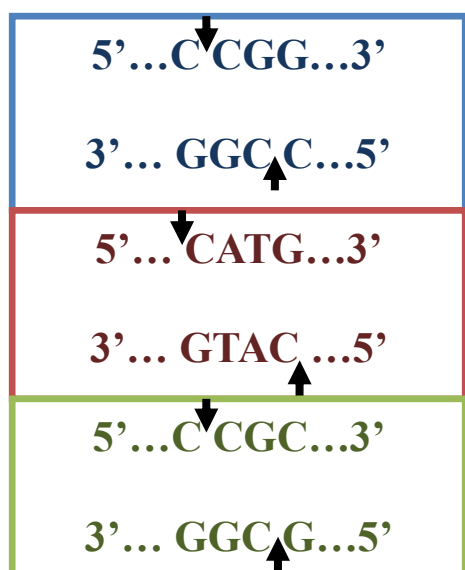


Figura Suplementar 6 – Sequência de corte da enzima MspI.

Figura Suplementar 7 – Sequência de corte da enzima NlaIII.

Figura Suplementar 8 - Sequência de corte da enzima SsiI.

C.2 – Marcador de massa molecular de DNA

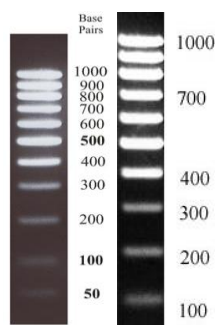


Figura Suplementar 8 – Marcadores de peso molecular de DNA (50 bp e 100 bp) (adaptado de <http://www.sibenzyme.com>).